

Université de Sherbrooke

Évaluation du potentiel thérapeutique d'inhibiteurs protéiques de c-Myc dans le cancer

Par

Richard Chamberland

Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Mémoire/Thèse présenté(e) à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada

Juin, 2019

Membres du jury d'évaluation :

Professeur Martin Lepage, Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Professeur Pierre Lavigne, Biochimie

Professeur Victor Jeffrey Leyton, Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Professeur Éric Marsault, Pharmacologie-Physiologie

© Richard Chamberland, 2019

À Vanessa,
puisses-tu insuffler à tes frères
une once de ton courage
dans les moments rébarbatifs.

Merci :

- 🙏 À la FMSS, au CRSNG et au FRQS pour les bourses de maîtrise.
- 🙏 À Martin Lepage, pour avoir toujours été sincère, franc et direct avec moi ; pour m'avoir encadré, et recadré lorsque c'était nécessaire.
- 🙏 À Pierre Lavigne, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et pour être toujours resté positif malgré les moments creux de ma motivation.
- 🙏 À mes deux directeurs, Martin et Pierre, qui n'ont jamais cessé de croire en moi, plus que je croyais en moi-même.
- 🙏 À Réjean Lebel pour m'avoir appris presque tout ce que j'ai fait dans ce projet ; pour avoir été toujours jovial, avec cynisme ou non.
- 🙏 À Martin Montagne pour m'avoir laissé porter son bébé, Mad1*DNKR ; pour sa patience et ses intérêts éclectiques sur lesquels nous échangeons avec passion.
- 🙏 Aux deux assistants de recherche qui ont été constamment disponible pour m'aider, et toujours patients avec moi.
- 🙏 À Dina Sikpa et à Mélanie Arsenault pour m'avoir appris beaucoup de manipulations palpitantes.
- 🙏 À Éric Marsault, pour avoir donné un avis chevronné sur ma maîtrise à chaque occasion.
- 🙏 À Emilie Bond, pour m'avoir motivé à lui donner un bon stage et ainsi être plus productif que jamais pendant 3 mois.
- 🙏 À l'équipe du CIMS
- 🙏 À l'équipe de Transfert Tech, qui, à l'époque de la SOCPRA, m'ont fait découvrir le brevet du Pr. Lavigne à la fin du bac, qui m'ont donné la soif de l'innovation et de l'entrepreneuriat en biotechnologies.
- 🙏 À Kevin Whittingstall pour m'avoir permis de terminer au travers de mon Pharm.D.

Résumé

Évaluation du potentiel thérapeutique d'inhibiteurs protéiques de c-Myc dans le cancer

Par

Richard Chamberland

Programme de Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maitre ès sciences (M.Sc.) en Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le facteur de transcription c-Myc est dérégulé dans une majorité de cancers, lors d'une cancérisation impliquant un oncogène en aval. Le laboratoire du Pr Pierre Lavigne a développé des inhibiteurs de c-Myc à partir de la structure moléculaire de Max p21 et de Mad1, son partenaire d'interaction obligatoire et son antagoniste physiologique. Succédant à la preuve de concept *in vitro*, ce projet a pour objectif d'établir la base méthodologique des expériences supportant le développement préclinique de ces agents. Nous étudions d'abord la demi-vie plasmatique (*ex vivo*) et la toxicité des candidats Max* et Mad1*DNKR. Avec ces informations, nous évaluons le métabolisme et la biodistribution de Mad1*DNKR dans la souris. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode de détection immunologique dans les échantillons biologiques. Finalement, en suivant par bioluminescence des tumeurs dans un modèle de cancer mammaire, nous tentons d'en confirmer l'efficacité et le potentiel thérapeutique.

Mots clés : cancer, développement préclinique, c-Myc/Max/Mad, Mad1*DNKR, métabolisme, biodistribution, bioluminescence

Table des matières

Résumé.....	iv
Table des matières	v
Liste des abréviations	x
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
1. Introduction.....	1
1.1 Les protéines comme agents thérapeutiques	1
1.2 Découverte d'un agent thérapeutique	2
1.2.1 Détermination de la cible	3
1.2.1.1 Aperçu de la physiopathologie du cancer	4
1.2.1.2 Rôle de c-Myc dans le cancer	6
1.2.1.3 Interactions protéiques et signaux de croissance	7
1.2.1.4 Le réseau c-Myc/Max/mad comme relais signalétique.....	9
1.2.1.5 C-Myc comme cible thérapeutique	10
1.2.2 Conception de l'agent thérapeutique	15
1.3 Développement préclinique d'un agent protéique ciblant c-Myc.....	19
1.3.1 Caractérisation et méthodes analytiques.....	19
1.3.2 Pharmacocinétique.....	20
1.3.3 Pharmacodynamie.....	23
1.3.4 Immunogénicité.....	24
1.3.5 Toxicologie.....	25
1.4 Projet de maîtrise	26

2. Méthodes	28
2.1 Développement de méthodes de détection.....	28
2.1.1 ELISA	28
2.1.2 Immunobuvardage de type Western	30
2.2 Détermination de la dose maximale tolérée	33
2.3 Stabilité métabolique	35
2.3.1 Demi-vie plasmatique <i>ex vivo</i>	36
2.3.2 Détermination du site de clivage.....	36
2.4 Pharmacocinétique in vivo	37
2.4.1 Demi-vie biologique.....	37
2.4.2 Choix de l'anticoagulant	39
2.4.3 Analyse des échantillons	39
2.4.4 Biodistribution	40
2.4.5 Prélèvement des organes	40
2.4.6 Extraction des protéines des tissus	41
2.4.7 Analyse par immunobuvardage de type Western.....	41
2.5 Efficacité	42
2.5.1 Modèle syngénique de cellules bioluminescentes 4T1-br-luc sur souris Balb/c	42
2.5.1.1 Modèle métastatique et sous-cutané	42
2.5.1.2 Modèle sous-cutané	44
2.5.1.3 Cellules 4T1-br bioluminescentes.....	44
2.5.2 Imagerie de bioluminescence.....	45
2.5.2.1 Matériel	45

2.5.2.2 Procédure d'acquisition des images de bioluminescence	46
2.5.3 Analyse des images de bioluminescence.....	48
2.5.3.1 Régions d'intérêt :	48
2.5.3.2 Filtre médian.....	48
2.5.3.3 Correction du bruit de fond	48
2.5.4 Analyse des données	50
3. Résultats	51
3.1 Méthodes de détection	51
3.1.1 ELISA	51
3.1.2 Immunobuvardage de type Western	52
3.2 Détermination de la dose maximale tolérée	54
3.3 Expériences de demi-vie.....	55
3.3.1 Demi-vie plasmatique ex vivo.....	55
3.3.1.1 Max*	55
3.3.1.2 Mad1*DNKR	56
3.3.2 Site de clivage	56
3.4 Métabolisme In vivo	57
3.4.1 Choix de l'anticoagulant	57
3.4.2 Demi-vie biologique.....	57
3.4.3 Biodistribution	60
3.5 Efficacité sur modèle de cancer <i>in vivo</i>	61
3.5.1 Modèle Métastatique.....	61
3.5.2 Modèle sous-cutané	62

4. Discussion	63
4.1 Méthodes de détection	64
4.1.1 ELISA	64
4.1.2 Immunobuvardage de type Western	66
4.2 Détermination de la dose maximale tolérée	67
4.3 Métabolisme.....	69
4.3.1 Stabilité ex vivo.....	69
4.3.1.1 Max*	69
4.3.1.2 Mad1*DNKR	69
4.3.1.3 Site de clivage	70
4.3.2 Métabolisme in vivo	71
4.3.2.1 Demi-vie pharmacocinétique vs demi-vie plasmatique	71
4.3.2.2 Modèle pharmacocinétique	72
4.3.2.3 Autres sources de variabilité expérimentale	73
4.3.2.4 Améliorations à apporter	73
4.4 Biodistribution	74
4.4.1 Détection dans les organes ciblés	74
4.4.2 Influence de la demi-vie	75
4.4.3 Limites expérimentales.....	76
4.3.4 Améliorations suggérées	76
4.3.4.1 Méthode de détection.....	76
4.3.4.2 Combinaison des expériences et répétitions.....	77
4.5 Efficacité	77

4.5.1 Modèle Métastatique.....	77
4.5.2 Modèle sous-cutané	78
4.5.3 Réactions au composé.....	79
4.5.4 Analyse des résultats	80
4.5.5 Suggestions.....	81
4.6 Conclusion	82
5. Liste des références.....	83

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNPolIII : ARN Polymérase II
b : Domaine basique
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BSA : Albumine bovine sérique ou *Bovine Serum Albumin*
c-Myc* : b-HLH-LZ de c-Myc
CCD : Dispositifs à transfert de charge ou *Charge Coupled Device*
CD : Dichroïsme circulaire
CIMS : Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke
DO : Densité Optique
E-Box : *Enhancer Box*
EGFR: récepteur du facteur de croissance épithélial ou *epidermal growth factor receptor*
ELISA : Essais immuno-enzymatique ou *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
HLH : Région Hélice boucle hélice ou *Helix-loop-helix*
HPLC : Chromatographie liquide à haute pression
HRP : Peroxydase de Raifort ou *Horseradish Peroxidase*
KRAS : *Kirsten rat sarcoma viral oncogene analog*
LC-MS/MS : Chromatographie liquide avec spectrométrie de masse en tandem ou *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*
LZ : *Leucine Zipper*
Mad: *Max Dimerising Factor* (nommé parfois Mxd)
Mad1* : b-HLH-LZ de Mad
MAPK: *Mitogen Activated Protein Kinases*
MTD : Dose maximale tolérée ou *Maximal Tolerated Dose*
Max : *Myc-associated factor X*
NOAEL : Dose sans effet nocif observable ou *no observed adverse effect level*
NSCLC : Adénocarcinome pulmonaire humain ou *Non-Small Cell Lung Cancer*
OPD : Ortho-phenylenediamine
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
SDS-PAGE : Électrophorèse en gel de polyacrylamide avec dodécyl sulfate de sodium ou *Sodium-Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
siRNA : Petits ARN inhibiteurs ou *small inhibitor RNA*
TAD : Domaine de Transactivation ou *Transactivation domain*
UV : Ultraviolet
WT : De type sauvage (sans mutation) ou *wild-type*

Liste des tableaux

Tableau 1. Critères de détermination de souffrance de la souris. Erreur! Signet non défini.	
Tableau 2. Combinaisons d'anticorps résultant à un ratio signal-bruit >2 pour 5 µg/mL de Mad1*DNKR	51
Tableau 3. Valeurs moyennes de densité optique (n = 2) des concentrations d'anticorps titrées résultant en un ratio signal-bruit >2 pour différentes concentrations de Mad1*DNKR	52
Tableau 4. Liste du matériel utilisé pour l'immunobuvardage.....	52
Tableau 5. Demi-vie pharmacocinétique de Mad1*DNKR par immunobuvardage de type Western.....	58

Liste des figures

Figure 1. Schématisation du développement d'un médicament.	3
Figure 2. Sceaux du cancer	5
Figure 3. Schéma simplifié de la signalisation de la voie des MAPK.....	8
Figure 4. Interrelation de c-Myc, Max et Mad dans le fonctionnement d'une cellule.	10
Figure 5. Mode d'action physiologique du facteur de transcription c-Myc	11
Figure 6. Structure moléculaire des B-HLH-LZ de c-Myc et Max lié à l'ADN.....	12
Figure 7. Débordement de c-Myc sur les promoteurs d'autres gènes.....	13
Figure 8. Mécanisme d'action des b-HLH-LZ à visée thérapeutique.	15
Figure 9. Effet des mutations sélectives sur le b-HLH-LZ de Mad (Mad1*).	18
Figure 10. Mécanismes de distribution empruntés par les protéines thérapeutiques	22
Figure 11. Modèles pharmacocinétiques mono-compartmental et bi-compartmental....	22
Figure 12. Séquence du développement des b-HLH-LZ optimisés.	26
Figure 13. Diagramme de titrage pour le développement d'un ELISA sandwich	29
Figure 14. Schéma d'un SDS-PAGE et d'un immunobuvardage de type Western :.....	31
Figure 15. Méthodes de détection immunologique.....	33
Figure 16. Séquence des expériences de toxicité.....	34
Figure 17. Distinction des bandes de Mad1*DNKR et son produit de dégradation ;	37
Figure 18. Schéma de l'expérience de demi-vie plasmatique in vivo.....	38
Figure 19. Schéma de l'expérience de biodistribution.	40
Figure 20. Séquences expérimentales des expériences d'efficacité.	43
Figure 21. Tumeurs de cellules 4T1-br-luc bioluminescentes.	44
Figure 22. Interface du programme d'analyse d'images de bioluminescence.	47
.....	50
Figure 23. Méthode de correction du bruit de fond calculé.	50
Figure 24. Courbe Standard de Mad1*DNKR en immunobuvardage de type Western.	53
Figure 25. Compilation des valeurs d'intensité de Mad1*DNKR de sept immunobuvardages de type Western calibrés avec ImageJ.	54
Figure 26. Détermination de la dose maximale tolérée de A) Mad1*DNKR et B) Max*.	54

Figure 27. Stabilité ex-vivo de Max* en fonction du temps dans le plasma de souris Balb/c.	55
Figure 28. Stabilité ex-vivo de Mad1*DNKR.....	56
Figure 29. Séquence d'acides aminés de Mad1*DNKR et de son fragment clivé <i>ex vivo</i> , élucidé par Phenoswitch Biosciences.....	57
Figure 30. Évaluation de la demi-vie plasmatique de Mad1*DNKR dans l'animal avec la décomposition mono-exponentielle du signal à différents temps.....	59
Figure 31. Immunobuvardages d'organes sélectionnés et de standards de Mad1*DNKR..	60
Figure 32. Effet d'une dose unique de Mad1*DNKR (bolus IV dans la veine caudale) sur la charge tumorale des souris avec tumeurs sous-cutanées et métastases de cellules 4T1...	61
Figure 33. Effet de 6 doses Mad1*DNKR, à raison de 3 par semaine, sur la charge tumorale des souris avec tumeurs sous-cutanées de cellules 4T1	62
Figure 34. Disposition proposée des échantillons sur une plaque pour calibrer l'ELISA.	65
Figure 35. Séquences des acides aminés des B-HLH-LZ de Max* et de Mad1*DNKR.	71

1. Introduction

Fruit de décennies de recherches pointues sur la biologie moléculaire et structurale des facteurs de transcriptions c-Myc, Max, et Mad, la technologie des b-HLH-LZ tronqués du professeur Lavigne semble prometteuse pour traiter de nombreux cancers. Ses recherches sur les mécanismes de reconnaissance moléculaire entre ces b-HLH-LZ ont permis de faire le design d'analogues du b-HLH-LZ de Mad1 (Mad1*) permettant d'inhiber certaines fonctions oncogéniques de c-Myc, et pénétrant dans les cellules et les noyaux de façon spontanée. Cette idée doit maintenant passer au crible des épreuves qui confirmeront son potentiel thérapeutique. J'ai donc effectué, dans le cadre de ma maîtrise en Sciences des Radiations et Imagerie Biomédicale, les expériences entamant la validation préclinique des analogues de Mad1*, dans l'espoir ambitieux d'enfanter un médicament. Ce mémoire adopte la perspective du développement d'un médicament biologique, puisque nous devons les principaux écueils du projet aux particularités de cette classe thérapeutique.

1.1 Les protéines comme agents thérapeutiques

Les médicaments biologiques diffèrent des médicaments dits « à petite molécule » (*small molecule*) principalement par leur taille, leurs propriétés physico-chimiques et leur mode de fabrication. En contrepartie à la chimie organique de synthèse, ils sont produits par des systèmes vivants comme des bactéries, des levures, des cellules en culture, ou même des organismes entiers. (p. ex. Cozazym, Pregnyl (Merck Canada Inc., 2015; Merck Canada Inc, 2017)). Il s'agit de macromolécules composées des mêmes blocs de constructions que les organismes qu'ils traitent : protéines, ADN, ARN, ou une combinaison sous forme de virus par exemple. (p. ex. Mipomersen, (Kastle Therapeutics Llc, 2016)). Plus largement, l'annexe D de la *Loi sur les aliments et les drogues* inclut aussi les cellules humaines, les préparations de sang et les substances allergènes. (Ministère de la Justice, 2019) Les médicaments biologiques utilisés en clinique sont généralement des protéines. Il s'agit entre autres de facteurs de croissance (p. ex. érythropoïétine, somatolibérine), de cytokines (p.ex.

Neupogen, Luxturna (Amgen Canada Inc., 2018; Spark Therapeutics, 2017)), d'enzymes, d'anticorps monoclonaux ou de leurs dérivés.

Les protéines thérapeutiques sont utilisées depuis environ un siècle. À la fin du 19^e siècle, la sérothérapie utilisait des anticorps d'animaux pour traiter des infections par immunisation passive. En 1922, l'insuline d'extrait pancréatique fut isolée pour traiter le diabète de type 1. Dans les années 80, les avancées biotechnologiques comme le génie génétique et l'hybridome ont mené au développement des protéines recombinantes et des anticorps monoclonaux respectivement. Ceux-ci ont enrichi l'arsenal thérapeutique jusqu'à donner aux protéines une place prépondérante dans l'industrie pharmaceutique (Dimitrov, 2012) En 2012, les médicaments biotechnologiques présentaient la plus grande croissance de marché par rapport aux autres segments comme les génériques, l'oncologie et les médicaments spécialisés. (Industrie du Canada, 2013). En 2016, sept des dix principaux produits pharmaceutiques au Canada étaient des médicaments biologiques. (Direction générale de la fabrication et des sciences de la vie Innovation Sciences et Développement économique Canada, s. d.) En 2017, les médicaments biologiques représentaient 22,1% des dépenses en médicaments prescrits (Institut Canadien d'Information sur la Santé, 2017). À la différence des petites molécules, les médicaments biologiques ne sont en général pas administrés par voie orale et sont donnés par voies parentérales (injections i.v., s.c., inhalation) à cause de leurs propriétés physicochimiques (polarité, poids moléculaire principalement) qui les empêche de traverser les membranes cellulaires et donc d'être absorbés oralement. Leur nature peptidique les rend aussi susceptibles à la digestion dans le tractus gastrointestinal. Il faut noter toutefois que certains peptides sont en développement clinique avancé sous formulations orales, bénéficiant des développements récents dans le domaine de la formulation. (p. ex. incrétines de chez Novo Nordisk)

1.2 Découverte d'un agent thérapeutique

Le développement d'un agent biotechnologique, de sa conception à sa mise en marché, est analogue à celui de tout médicament. (Figure 1) Les sections 1.2 et 1.3 abordent la

recherche fondamentale, la découverte, et le développement préclinique mis en œuvre par le Pr Lavigne autour des inventions de son laboratoire.

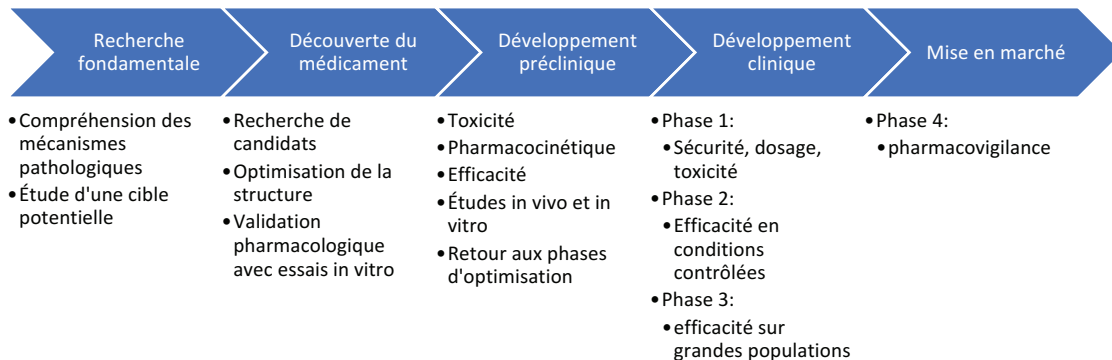


Figure 1. Schématisation du développement d'un médicament.

1.2.1 Détermination de la cible

Plusieurs approches pharmacologiques sont possibles pour déterminer la modalité de traitement d'une maladie avec une protéine. Par exemple, il peut s'agir du remplacement d'une hormone manquante comme l'insuline (Dimitrov, 2012) ou d'un agent chimérique qui contrecarre un mécanisme pathologique (p. ex. Enbrel (AMGEN CANADA INC. & Immunex Corporation, 2018)). Cela dépend de la pathologie. Lorsqu'une cible est extracellulaire comme un antigène ou un récepteur, elle peut être atteinte par une macromolécule comme un anticorps. (L. Zhou, Xu, Sun, & Liu, 2014) Parfois, il est irréaliste d'utiliser une approche par criblage de milliers de molécules de par la complexité des mécanismes en jeu (section 1.2.1.3). On parle de conception rationnelle de médicaments lorsqu'il est nécessaire de connaître la pathophysiologie d'une maladie pour choisir une cible, et que l'on étudie la structure moléculaire de cette dernière pour développer un composé sur mesure. Cette dernière doit être atteignable afin de détourner ou ralentir le cours de la maladie. Le présent projet porte sur un traitement développé contre le cancer. La cible est c-Myc, une protéine centrale à la biologie moléculaire de plusieurs cancers.

1.2.1.1 Aperçu de la physiopathologie du cancer

Le cancer survient, entre autres, lorsqu'une quantité suffisante de gènes régulateurs de la prolifération cellulaire subissent des mutations, altérant ainsi le comportement de la cellule de celui dicté par l'organisme. Certains de ces gènes deviennent des oncogènes pilotes et conduisent les cellules à se diviser anormalement jusqu'à former une tumeur. Par exemple, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene analog*) sont des oncogènes fréquemment impliqués dans plusieurs néoplasies (Cabanero et al., 2017; Oda et. al., 2005; Singh et al., 2010). Bien que le cancer désigne une panoplie de maladies différentes, plusieurs caractéristiques pathologiques communes ont été reconnues comme les « sceaux du cancer » (Figure 2) (Hanahan & Weinberg, 2011) :

1. Les cellules cancéreuses se maintiennent dans un état prolifératif constant en dérégulant les signaux de croissance. Ces signaux proviennent en majorité de facteurs de croissance circulant dans l'organisme et s'arrimant à des récepteurs tyrosine-kinase.
2. Les cellules cancéreuses évitent les signaux de rétroaction négative, qui empêchent normalement les comportements cellulaires inadéquats.
3. La levée de ces freins de secours moléculaires sur le cycle cellulaire engendre un évitement de l'apoptose.
4. Un autre évènement similaire, l'immortalité répllicative, leur permet d'échapper à la sénescence, sorte de vieillissement moléculaire de la cellule qui arrête la division et la croissance.
5. Le métabolisme des cellules est complètement reprogrammé pour répondre à la demande énergétique exacerbée.
6. La perte des signaux d'arrêt de croissance a aussi pour conséquence de permettre aux cellules cancéreuses d'envahir les tissus environnants et de devenir métastatiques.
7. L'instabilité génétique et l'accumulation de mutations permet à la maladie de s'adapter aux différentes défenses de l'organisme.
8. La plasticité génétique permet entre autres au cancer d'échapper au système immunitaire au fil de sa pathogénèse.

9. L'angiogenèse provoque le développement de vaisseaux au sein d'une tumeur pour alimenter en oxygène et en nutriments les régions centrales hypoxiques.
10. L'environnement tumoral est caractérisé par un état inflammatoire qui enrichit les processus oncogéniques par des facteurs de croissance ou de survie.

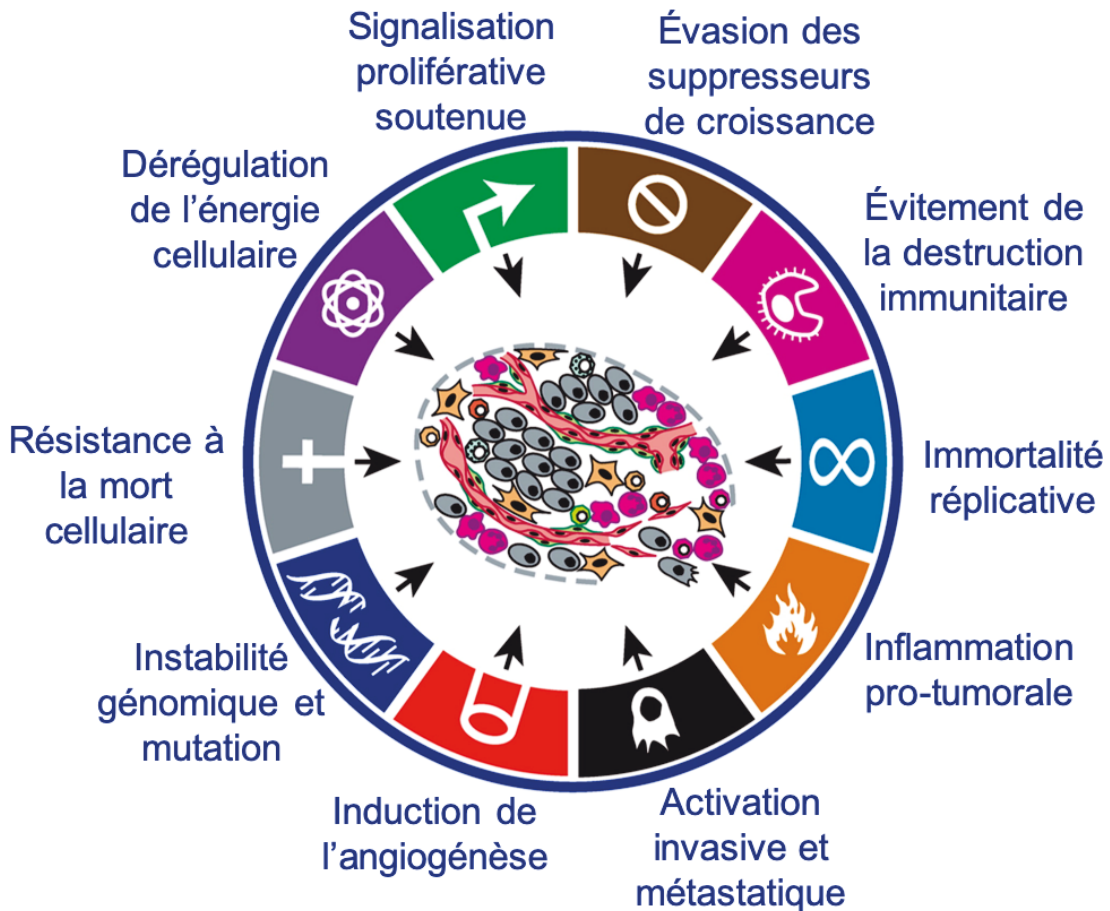


Figure 2. Sceaux du cancer

Ces caractéristiques englobent la physiopathologie du cancer. (Adapté et traduit à partir de : Hanahan & Weinberg, 2011; Creative Commons, No. de licence: 4653620849714)

La recherche permet de comprendre les mécanismes moléculaires qui soutiennent les sceaux du cancer en vue de développer des traitements plus spécifiques. Justement, la théorie de la dépendance à l'oncogène postule que les cellules cancéreuses dépendent d'un nombre de signaux oncogéniques limité pour survivre. En inhibant le produit des gènes mutés à l'origine de ce dérèglement, l'activité cellulaire s'effondrerait et laisserait place à

la mort cellulaire ou à la senescence. (Weinstein & Joe, 2008). Par exemple, certaines thérapies à base d'anticorps monoclonaux exploitent ces mécanismes étiologiques du cancer (Kintzing et. al., 2016; Zhou, et. al. 2014). Il en résulte une modalité de traitement mieux tolérée que la chimiothérapie cytotoxique classique.

1.2.1.2 Rôle de c-Myc dans le cancer

Normalement, l'expression et la dégradation de c-Myc sont finement régulés afin d'en garder les niveaux bas (Farrell & Sears, 2014; Grandori et. al., 2000; Kalkat et al., 2017; W. Zhang & Liu, 2002). On le retrouve hautement exprimé et la moitié des cancers (Ciriello et al., 2013; Giardino Torchia & Ashwell, 2018). Cela peut être dû à la signalisation d'oncogènes pilotes en amont affectant sa stabilité. Pour donner un exemple sur le premier cas, suite à des mutations qui les rendent constitutivement actifs, des récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGFR ou des effecteurs de la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) stabilisent c-Myc, qui induit les programmes transcriptionnels oncogéniques. (Sears et al., 2000; Soucek et al., 2008). Dans certains cancers, c-Myc pilote l'oncogénèse puisque des altérations chromosomiques affectent directement son expression (Meyer & Penn, 2008). Dans le Lymphome de Burkitt, une translocation chromosomique juxtapose le promoteur d'une immunoglobuline à la séquence codante de c-Myc et décuple son expression. Il s'agit d'un des gènes le plus fréquemment amplifié dans tous les types de cancers, notamment dans le neuroblastome, dans lequel on en a de nombreuses copies (Ciriello et al., 2013; Kalkat et al., 2017).

Dans tous les cas, c-Myc, est impliqué dans plusieurs des sceaux du cancer car il détourne les programmes prolifératifs de la cellule (Dang, 2012; Felsher, 2010; Gabay, Li, & Felsher, 2014). En effet, la sur-activation oncogénique de c-Myc peut-être le résultat d'une signalisation proliférative soutenue, contribue à la perpétuation du cycle cellulaire (García-Gutiérrez et. al., 2019) et à la division continue des cellules (Dang, 2013), affecte le micro-environnement tumoral (Whitfield & Soucek, 2012), entraîne une instabilité génomique (Karlsson et al., 2003; Kumari et. al., 2017), contribue au caractère malin et métastatique

des tumeurs (Ma et al., 2010; Ott, 2014), dévie le métabolisme afin de soutenir la prolifération (Hsieh et al., 2015; Stine et al., 2015).

Ce rôle global suggère que certains cancers sont dépendants à c-Myc lorsqu'il est surexprimé (Felsher, 2010; Vivanco, 2014). Lorsqu'un la protéine exprimée par un oncogène pilote de la voie des MAPK est inhibé, la pression de sélection engendrée favorise les mutations qui maintiennent cet équilibre (Cabanero et al., 2017). Ainsi, l'inhibition de c-Myc, en aval de cette voie (W. Zhang & Liu, 2002), contrecarrerait cette addiction (Section 1.2.1.5) (Gabay et al., 2014; Hsieh et al., 2015). De nombreux travaux de recherche confirment cette hypothèse (Soucek et al., 2008, 2013a) (Section 1.2.1.5).

1.2.1.3 Interactions protéiques et signaux de croissance

La génomique du cancer et la biologie moléculaire ont permis de dénouer les réseaux de protéines impliqués dans la signalisation oncogénique des sceaux du cancer. Les interactions protéine-protéines sont les nœuds et pivots de ces réseaux (Ivanov et al., 2013). Elles intègrent les signaux oncogéniques en un comportement cellulaire pathologique. Il s'agit donc d'un angle d'attaque prometteur au niveau thérapeutique.

Déranger une interaction protéine-protéine est un objectif pharmacologique bien plus complexe que d'affecter le fonctionnement d'une protéine par une petite molécule. La surface d'interaction en jeu est très différente. Généralement, une cavité définit l'interface entre une petite molécule et une protéine, avec un volume de quelques centaines d'Å³. À l'inverse, l'interface entre deux protéines est plus grande, plane ou texturée, représentant une surface de plusieurs centaines à milliers d'Å² (Fletcher & Prochownik, 2015). Dans le cas des dimères formés dans le réseau c-Myc/Max/Mad, l'interface est de 3206 Å² pour le dimère c-Myc/Max et 2970 Å² pour Mad/Max (Nair & Burley, 2003). Qui plus est, lorsqu'il n'interagit avec aucune autre protéine, c-Myc possède une structure désordonnée, ce qui complique sa stabilisation dans une conformation inefficace par la liaison d'un agent externe (Yu et al., 2016).

Il est donc compliqué de perturber l'interaction à l'aide d'une petite molécule (Wells & McClendon, 2007). À cet effet, les protéines entières et les peptidomimétiques – molécules

dérivées de peptides simulant l'interface d'une protéine – sont plus efficaces pour interférer dans les interactions macromoléculaires. Le laboratoire du Pr Pierre Lavigne étudie les déterminants moléculaires impliqués dans l'interaction des facteurs de transcription du réseau Myc/Max/Mad (section 1.2.1.4). Dans le but d'empêcher la dimérisation de c-Myc avec Max, ils ont développé des agents protéiques en s'inspirant du domaine b-HLH-LZ, site de l'interaction protéine-protéine entre les deux.

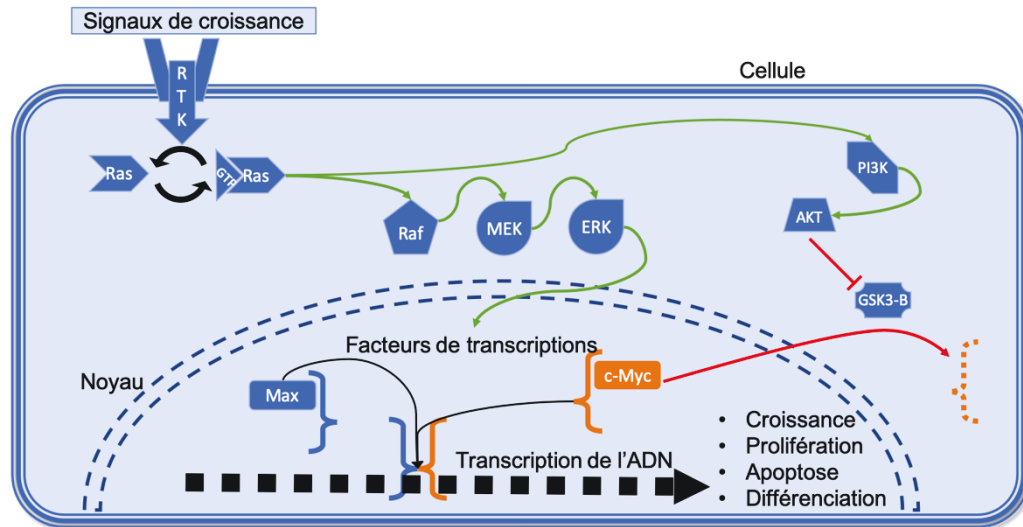


Figure 3. Schéma simplifié de la signalisation de la voie des MAPK.

Lorsqu'un facteur de croissance lie et active un récepteur tyrosine kinase, celui-ci recrute des protéines adaptatrices qui permettent de former un complexe avec la kinase Ras pour la phosphoryler. Ensuite, Ras s'active en liant une molécule de guanosine triphosphate. Ras phosphoryle Raf, qui active ensuite MEK, qui active ERK. ERK se transloque au noyau et phosphoryle une gamme de facteurs de transcription qui activent les programmes cellulaires appropriés.

Ces interactions macromoléculaires sont légion dans le fonctionnement d'une cellule. Lorsqu'il ne s'agit pas de réactions enzymatiques, les processus qui traduisent des signaux ou des comportements sont basés sur l'arrimage de protéines spécifiques dans un but particulier. La voie des MAPK joue un rôle important dans la transduction d'une myriade de signaux extracellulaires en réponses cellulaires. Elle est composée de différentes enzymes, des kinases, qui s'activent en série par phosphorylation (Figure 3) (W. Zhang &

Liu, 2002). La réponse de la cellule à un signal donné dépend de différents facteurs quantitatifs, qualitatifs et contextuels, et implique potentiellement des centaines de protéines (Oda et. al. , 2005). Néanmoins, les signaux entrants sont traités par des processus moléculaires centraux plus restreints d'où émergent les mécanismes de rétroaction déterminant le comportement résultant (Lemmon & Schlessinger, 2011). C-Myc est un de ces nœuds centraux à l'intégration des signaux de croissance. Lorsqu'il est activé, c-Myc est stabilisé, se lie à son partenaire de dimérisation Max, puis aux promoteurs de gènes particuliers impliqués dans la croissance, la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Sa contribution au comportement cellulaire résultant est de maintenir la chromatine dégagée au niveau du gène cible et de lever la pause transcriptionnelle.

1.2.1.4 Le réseau c-Myc/Max/mad comme relais signalétique

c-Myc exerce son action au sein d'un réseau de facteurs de transcription de type b-HLH-LZ (Figure 4). Cette classe comprend de nombreuses variations des trois composantes suivantes : la famille MYC (c-Myc, n-Myc, l-Myc) promouvant l'activation de gènes prolifératifs; Max (*Myc-associated factor X*) exprimé constitutivement et partenaire d'interaction obligatoire de c-Myc; et les protéines dimérisant avec Max (*Max dimerising factor*, MXD ou Mad, dont Mad1, Mad2, Mad3, Mad4) qui répriment les gènes activés par c-Myc (Diolaiti et. al., 2015). Par souci de constance, seules les protéines c-Myc, Max et Mad1 sont prises en exemple et concernées dans le présent mémoire, et Mad1 sera désigné comme Mad. Lorsqu'il est transcrit, activé et stabilisé, c-Myc se dimérise avec Max et colonise la chromatine ouverte lorsqu'il rencontre sa séquence d'ADN canonique E-box. Il active la transcription de gènes clés dans la prolifération cellulaire. La composante inhibitrice Mad1 intervient lorsque la cellule doit sortir du cycle cellulaire et se différencier (Cultraro et. al., 1997; Diolaiti et al., 2015). Mad1, graduellement exprimé, se dimérise avec Max et prend la place des dimères Myc/Max de l'ADN. Ce faisant, la transcription est réprimée et un autre programme cellulaire est enclenché (Chin et al., 1995; Hurlin et. al., 1994; Link & Hurlin, 2014; Zhou & Hurlin, 2001).

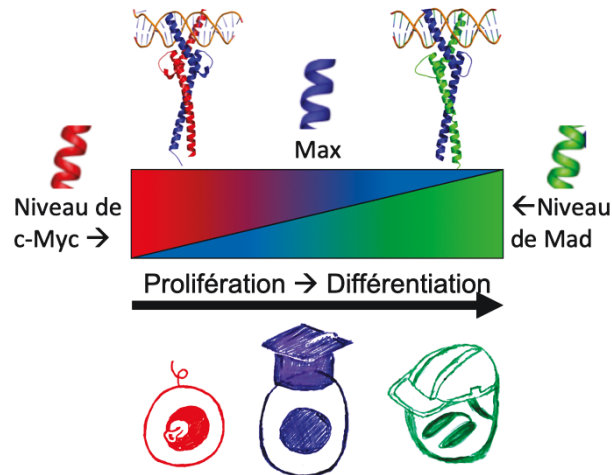


Figure 4. Interrelation de c-Myc, Max et Mad dans le fonctionnement d'une cellule.

c-Myc est présent lorsque la cellule est dans un mode prolifératif. À mesure qu'une cellule se différencie, Mad est exprimé et prend la place de c-Myc dans les dimères avec Max et sur les séquences d'ADN E-box. Il peut ainsi changer le programme transcriptionnel de la cellule afin qu'elle sorte du cycle cellulaire et se différencie adéquatement. Par exemple, dans l'intestin, c-Myc est davantage exprimé dans les cryptes où les cellules prolifèrent alors que l'expression de Mad et Max augmente en suivant les ex villosités, le long desquelles les cellules se différencient (Chin et al., 1995; Mariadason et al., 2005) (Structures moléculaires : Loïka Maltais).

1.2.1.5 C-Myc comme cible thérapeutique

Afin de justifier le développement d'une thérapie ciblant c-Myc, il importe de détailler sa fonction et sa structure. C-Myc est un facteur de transcription, c'est-à-dire, une protéine qui affecte la transcription des gènes en interagissant avec l'ADN. De manière générale, les facteurs de transcription possèdent un domaine pouvant lier l'ADN et un domaine permettant l'interaction avec d'autres protéines. Ils lient des séquences régulatrices d'ADN nommées amplificateur (communément appelés *enhancer*) et promoteur. En aval de la signalisation cellulaire, ils servent à réguler finement l'expression des gènes selon le contexte, de concert avec d'autres mécanismes comme les modifications de la chromatine

et les siRNA (petits ARN inhibiteurs ou *small inhibitor RNA*) (Lorenzin et al., 2016; Phillips & Hoopes, 2008). Un ensemble de facteurs de transcription et de cofacteurs peut activer ou inhiber la transcription génique en agissant sur la compaction de la chromatine et sur l'activation de la machinerie transcriptionnelle entourant l'ARN Polymérase II (ARNPolII) (Adams & O'Connor, 2010).

En l'occurrence, c-Myc lie un amplificateur surnommé E-Box (*enhancer box*) canonique dont la séquence nucléotidique consensus est le palindrome CACGTG, ou CANNTG. C-Myc doit obligatoirement interagir avec Max pour exercer ses fonctions. Quand le dimère c-Myc/Max reconnaît une séquence E-box, c-Myc interagit par son TAD avec l'histone acétylase et d'autres facteurs de transcription formant un complexe avec l'ARN polymérase II. La chromatine environnante est décompactée par acétylation des histones, la pause transcriptionnelle de l'ARNPolII est levée, puis le gène est transcrit en ARNm (Figure 5) (Bradner et. al., 2017; Conacci-Sorrell et. al., 2014; Lüscher & Vervoorts, 2012; Lüscher & Larsson, 1999). Ainsi, inhiber c-Myc de manière directe consiste à empêcher sa dimérisation avec Max ou sa liaison à l'ADN pour empêcher la transcription.

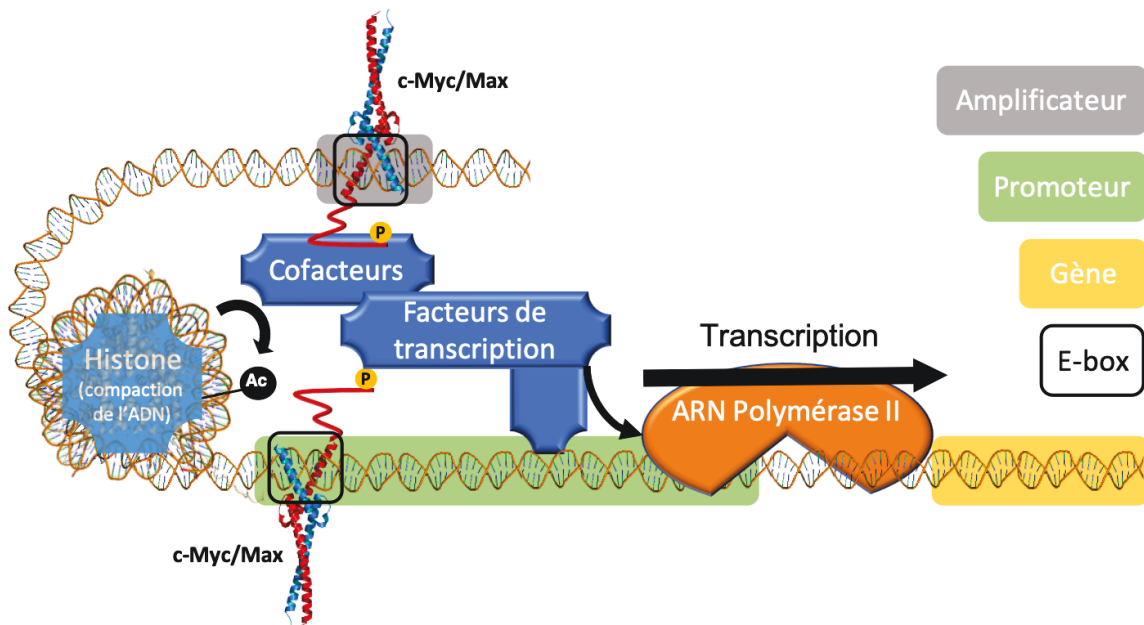


Figure 5. Mode d'action physiologique du facteur de transcription c-Myc

L'approche rationnelle pour inhiber c-Myc se base sur la structure protéique entière de la protéine et non une simple cavité (section 1.2.1.3). C-Myc est un facteur de transcription de la famille des b-HLH-LZ. (Figure 6) Le domaine basique (b) reconnaît et lie la séquence d'ADN E-box (pour *enhancer box*). La région hélice-boucle-hélice (HLH pour *Helix-Loop-Helix*) désigne une paire d'hélices alpha séparées d'une boucle, région importante pour la dimérisation de c-Myc avec ses partenaires d'interaction. Le *leucine-zipper* (LZ) est une longue hélice alpha surmontée de nombreuses leucines et permettant l'accolement de deux b-HLH-LZ par des interactions hydrophobes (Lüscher & Larsson, 1999; Soucek et al., 1998). Un domaine de transactivation (TAD) surmontant le domaine basique interagit avec la machinerie transcriptionnelle.

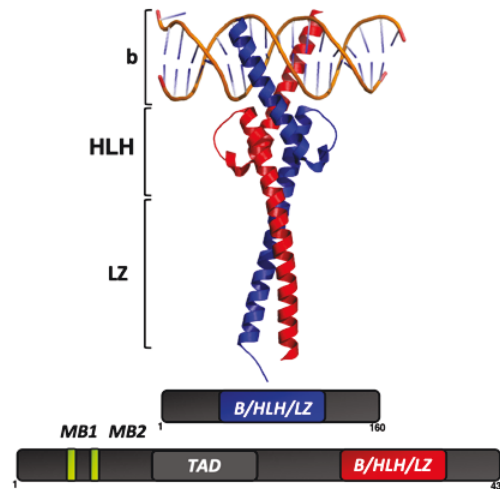


Figure 6. Structure moléculaire des B-HLH-LZ de c-Myc et Max lié à l'ADN

En temps normal, c-Myc est rapidement dégradé, ce qui restreint son activité à ces contextes précis. Toutefois, lorsque la signalisation en aval est excessive, il se retrouve en excès au noyau. Dans une cellule saine, un excès de c-Myc cause l'apoptose comme mécanisme de sécurité pour éviter une prolifération dérégulée (Gabay et al., 2014; Meyer & Penn, 2008). Dans une cellule cancéreuse dysfonctionnelle, l'excédent de c-Myc déborde vers les autres promoteurs de gènes contenant des séquences, E-box ou non, de plus faibles affinités (Wolf, Lin, Eilers, & Levens, 2015). Des gènes anti-apoptotiques sont alors exprimés

en excès, et les cellules contournent les rétrocontrôles inhibiteurs de c-Myc et font basculer son équilibre vers un état hyperprolifératif soutenu (Figure 7) (Li et. al., 2014).

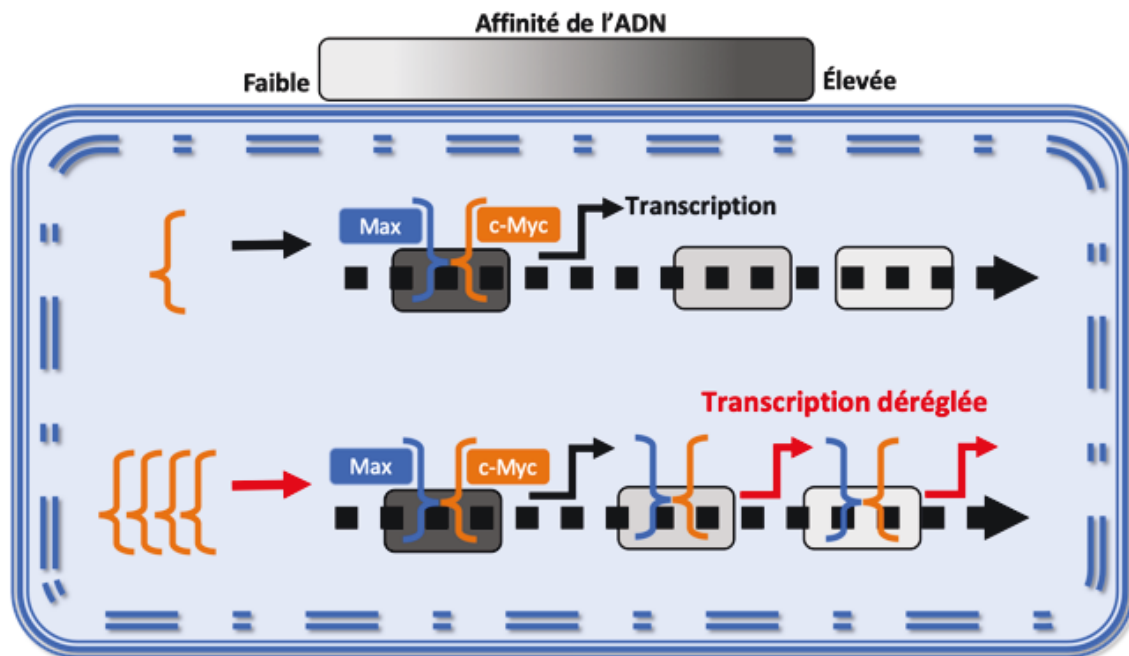


Figure 7. Débordement de c-Myc sur les promoteurs d'autres gènes

c-Myc lie les séquences d'ADN de promoteurs ou d'amplificateurs avec lequel il a moins d'affinité lors d'une signalisation oncogénique (en bas) par rapport à des signaux de croissance normaux (en haut) (Traduit et adapté de Wolf et. al., 2015; Elsevier, No. Licence: 4616690218625)

En conséquence, pour une étiologie oncologique impliquant c-Myc, empêcher cette expression non-spécifique des gènes serait en soi suffisant pour que la cellule tombe en apoptose (Gabay et. al., 2014; Soucek et al., 2008; Walz et al., 2015).

Depuis sa découverte et le dévoilement de son rôle de conducteur oncogénique, c-Myc est une cible convoitée dans le traitement du cancer. En effet, sa centralité dans la signalisation cellulaire en aval des voies dérégées dans le cancer en fait un véritable talon d'Achille de la cellule cancéreuse. Dans les modèles transgéniques de cancer où c-Myc est impliqué, l'inhibition de son expression ou de son activité cause une régression partielle ou complète des tumeurs (Jain et al., 2002; Li et. al. , 2014; Soucek et al., 2008; Zhang et. al. 2009).

Puisque l'inhibition directe consiste à bloquer des interactions macromoléculaires, un mode d'action plus complexe que l'activité catalytique d'une enzyme ou la transduction d'un récepteur, c-Myc a longtemps été considéré une cible hors d'atteinte (Dang et. al., 2017). Ainsi, différentes stratégies ont été développées pour contrer l'action oncogénique de c-myc. De manière directe ou indirecte, des molécules ont été développées dans l'objectif d'altérer son expression, sa fonction, sa dégradation, ou son influence sur le métabolisme de la cellule (Allen-Petersen & Sears, 2019; Giardino Torchia & Ashwell, 2018; Whitfield et. al., 2017). Plusieurs petites molécules ont été développées dans le but d'inhiber l'interaction entre c-Myc et Max. Le caractère désordonné de c-Myc et l'interaction protéine-protéine en jeu (Section 1.2.1.3) ont entravé le développement d'inhibiteurs efficaces. Ces candidats se sont d'ailleurs retrouvés dans une impasse lors des essais in vivo qui ont révélé une pharmacocinétique désavantageuse (Fletcher & Prochownik, 2015). Les stratégies se sont donc tournées vers des mécanismes indirects, comme l'inhibition de la transcription de l'ARNm de c-Myc (B. J. Chen et. al., 2014), ou l'inhibition de l'enzyme dégradant Mad1 (Giardino Torchia & Ashwell, 2018). Au tournant de la décennie, plusieurs recherches ont contourné les obstacles à l'inhibition directe et ont généré des composés avec des propriétés intéressantes (Allen-Petersen & Sears, 2019; B. J. Chen et al., 2014; Whitfield et al., 2017; Yu et al., 2016).

Une preuve de concept pour l'efficacité de l'inhibition direct de c-Myc fut le développement d'Omomyc, un analogue modifié du b-HLH-LZ de c-Myc. Initialement utilisé comme transgène exprimé en cellules ou en animal, Omomyc servit à énoncer qu'il était possible d'entraver l'action de c-Myc à l'aide d'une autre protéine, et possiblement d'un agent externe. (Beaulieu et al., 2019; Soucek et al., 1998, 2002; Whitfield et. al., 2017). Grâce aux modifications consciencieuses de sa séquence, Omomyc démontre un mécanisme d'action particulier. Il peut dimériser avec c-Myc et nuire à sa liaison à l'ADN, dimériser avec Max et l'empêcher d'interagir avec c-Myc et il peut former des homodimères Omomyc/Omomyc qui occuperont, avec les dimères Omomyc/Max, les sites E-box que c-Myc occuperait. (Figure 8) Ce faisant, il inhibe l'activité transcriptionnelle de c-Myc. Son potentiel thérapeutique sous forme de protéine, appuyé par la propriété des b-HLH-LZ de se rendre

jusqu'au noyau des cellules découverte par Montagne en 2012 (Beaulieu et al., 2019; Montagne et al., 2012), est présentement étudié par la compagnie Peptomyc et le laboratoire de Laura Soucek.

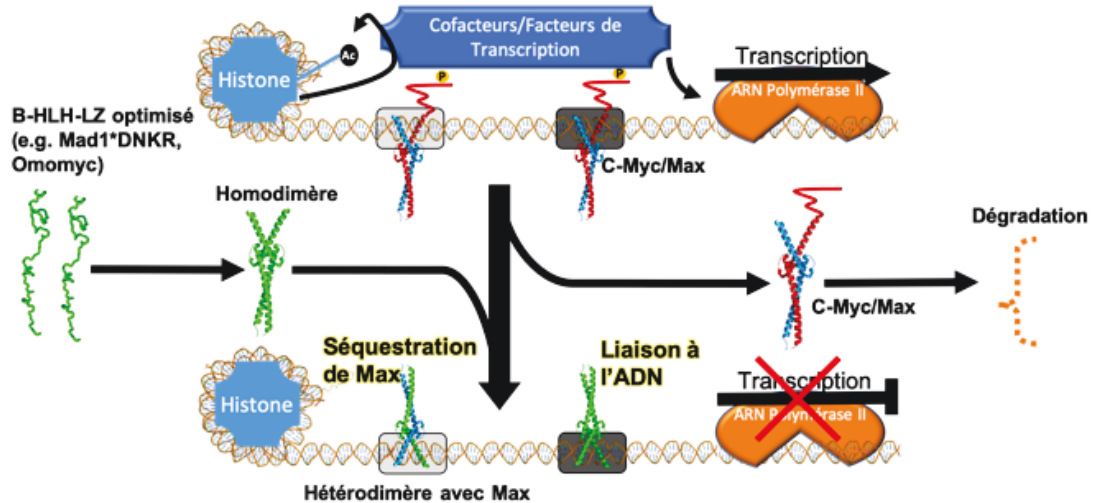


Figure 8. Mécanisme d'action des b-HLH-LZ à visée thérapeutique.

(Images : Loïka Maltais et laboratoire Pierre Lavigne)

Cette stratégie d'inhibition de c-Myc est très innovante dans le développement de médicaments. Plutôt que d'affecter une composante signalétique, ou un récepteur, elle bouleverse la dynamique d'interaction d'un réseau de facteurs de transcription. Ce réseau est dérégulé par l'excès, et non le mauvais fonctionnement, de c-Myc, une cible non redondante, véritable pivot de la biologie moléculaire du cancer.

1.2.2 Conception de l'agent thérapeutique

Durant leurs recherches sur les interactions entre c-Myc, Max, et Mad, l'équipe du Pr Lavigne a d'abord synthétisé la portion b-HLH-LZ de ces protéines pour caractériser l'influence de mutations précises dans leur reconnaissance moléculaire. Par opposition aux protéines entières, les b-HLH-LZ des protéines sont désignées par une étoile (*) succédant au nom de ces dernières p. ex. Max*, Mad1*.

Les b-HLH-LZ mutés ou optimisés sont produits avec des bactéries dans lesquelles un plasmide contenant le gène rapporteur de la séquence à exprimer et étudier. Par la suite, les bactéries sont lysées, et les protéines isolées par chromatographie.

Auparavant, la méthode préconisée pour étudier l'effet de Max* ou Omomyc sur les cellules eucaryotes était la transfection de leur gène pour qu'il soit exprimé *in situ*. En étudiant l'effet du b-HLH-LZ de Max (Max*) durant son doctorat, Martin Montagne a réalisé que ce fragment protéique entraît spontanément dans les cellules par endocytose et que l'administration directe de ce fragment protéique, sous forme d'homodimère, inhibe les activités transcriptionnelles de c-Myc tout en diminuant la prolifération des cellules de lignées cancéreuses dépendantes de c-Myc. Cette découverte signifiait que la structure primaire de Max* encode pour la propriété de pénétrer dans les cellules et se localiser au noyau. C'est cette observation qui révéla pour la première fois le potentiel thérapeutique des b-HLH-LZ (Montagne et al., 2012) (Figure 8).

En 2005, l'équipe du Pr. Lavigne a démontré qu'un résidu aspartate (D) à la position 112 sur le *leucine zipper* du b-HLH-LZ de Mad1 (Mad1*WT pour *Wild Type*, sans mutations) créait une répulsion électrostatique dans les conditions physiologiques et empêchait son homodimérisation. En d'autres mots, au pH retrouvé dans le noyau des cellules, l'acide aspartique présente une charge à l'interface des deux molécules qui déstabilise l'homodimère (Figure 9 A). Lorsque cet acide est muté pour une asparagine (N), le résidu amide de cette dernière crée une attraction polaire plutôt qu'une répulsion et favorise l'homodimère (Figure 9 B) (Montagne, et. al., 2005). Ce mutant, Mad1*DN, dimérise avec lui-même et Max et lie efficacement la séquence canonique d'ADN E-box, site spécifique du dimère c-Myc/Max. Par la suite, Martin Montagne et Loïka Maltais ont tenté améliorer l'homodimérisation et la liaison à l'ADN de Mad1*DN avec différentes mutations. Ils trouvèrent que la substitution d'une lysine (K) pour une arginine (R) dans le domaine basique favorise la liaison à l'ADN et favorise la liaison avec Max (Figure 9 C). (Patent N° WO 2017/185171 A1, 2017) En conséquence, la protéine Mad1*DNKR, plus efficace dans les essais *in vitro* que Max*, Omomyc et les versions précédentes de Mad1* devint le candidat principal du projet (Figure 9 D). Un autre avantage de ce b-HLH-LZ est que le

dimère Mad1*DNKR/Max lie fortement l'ADN, mais ne lie pas aussi fortement les séquences E-box canoniques reconnues par le dimère c-Myc*/Max*. Ainsi, lorsque c-Myc est surreprésenté en contexte oncogénique, Mad1*DNKR pourra le déloger des promoteurs liés de manière non-spécifique, (Figure 8), sans totalement l'empêcher de se lier spécifiquement aux E-Box canoniques, comme lors d'une expression normale (Figure 7) (Patent N° WO 2017/185171 AI, 2017). Expérimentalement, cela se traduit en une inhibition de la prolifération de cellules d'adénocarcinome pulmonaire H23, sans affecter celle de fibroblastes pulmonaires sains WI-28. De plus, on remarque l'effet de Mad1*DNKR sur la transcription de gènes activés par EGFR et RAS, protéines signalétiques en aval de c-Myc (Patent N° WO 2017/185171 AI, 2017). Ces b-HLH-LZ optimisés dans le laboratoire de Pierre Lavigne utilisent le même mécanisme d'action présenté à la figure 8.

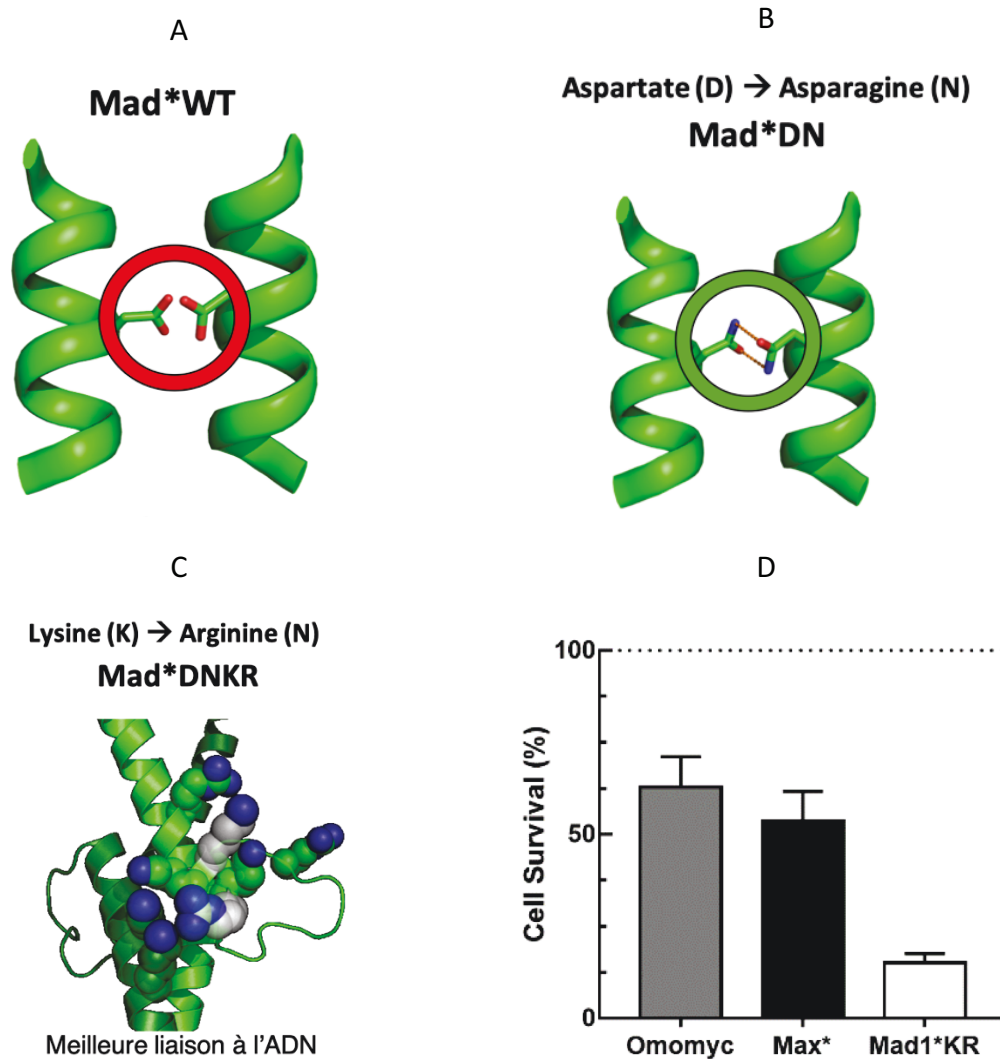


Figure 9. Effet des mutations sélectives sur le b-HLH-LZ de Mad (Mad1*).

A) Répulsion électrostatique entre les résidus aspartates de Mad*WT; B) Mad1*DN : homodimérisation possible lorsque l'Aspartate (D) est changée pour une Asparagine (N); C) Mad1*DNKR : Meilleure affinité pour l'ADN en mutant une lysine (K) pour une arginine[®]. D) Effet des b-HLH-LZ sur la survie de cellules A549 NSCLC en culture (Patent N° WO 2017/185171 A1, 2017) (Images : Loïka Maltais et laboratoire Pierre Lavigne).

1.3 Développement préclinique d'un agent protéique ciblant c-Myc

En regard du développement de médicaments, une fois qu'un candidat thérapeutique est établi débute l'évaluation de son potentiel en tant que « médicament » (Figure 1). Ces paramètres sont évalués par une panoplie d'essais précliniques qui serviront à améliorer le candidat, et à pousser la preuve de concept dans des modèles expérimentaux de plus en plus complexes. Il est à noter qu'il y a des différences importantes dans le développement d'un agent protéique par rapport aux petites molécules. Les méthodes de quantification utilisées pour celles-ci sont en général plus simples qu'avec les protéines. Une petite molécule et ses métabolites sont facilement détectables dans les échantillons biologiques lorsque l'on connaît les produits recherchés. À l'inverse, la détection d'une protéine particulière et ses fragments parmi les autres protéines d'un échantillon biologique nécessite des méthodes plus fastidieuses.

Le processus de développement est néanmoins semblable pour tous les médicaments : il est impératif d'optimiser une protéine thérapeutique après sa conception initiale. Les essais subséquents mettent en lumière les modifications de la séquence qui seront nécessaires. On peut chercher à améliorer la pharmacodynamie pour une meilleure affinité/liaison ou un début d'action rapide ou prolongé, la pharmacocinétique pour une meilleure distribution ou une demi-vie idéale, la stabilité physicochimique pour une meilleure stabilité, l'immunogénicité et la toxicité pour administrer de plus grandes doses sur un long terme. Nous verrons de tels exemples dans les paragraphes suivants propre au développement de Mad1*DNKR.

1.3.1 Caractérisation et méthodes analytiques

Lors de la conception d'une protéine thérapeutique, il est nécessaire d'en étudier la structure tridimensionnelle, déterminée par sa séquence. Le dichroïsme circulaire (CD), une technique spectroscopique utilisant les rayons ultra-violets, dévoile la quantité de structures secondaires dans la protéine et ses propriétés thermodynamiques lorsque relativisée à la température (Montagne et.al., 2007; Montagne et al., 2005; Naud et al., 2005; Naud et.al. 2003; Sauvé et.al., 2007). La résonance magnétique nucléaire et la

cristallographie aux rayons-x éclairent le positionnement d'une protéine au niveau atomique (Crommelin et.al., 2013; Meibohm, 2013).

Le volet pharmacocinétique du projet requiert la quantification de la protéine thérapeutique étudiée dans divers échantillons biologiques. Les techniques utilisées sur les petites molécules comme la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et la spectrophotométrie UV, ne conviennent pas nécessairement aux protéines, du moins pour les mêmes utilisations. Les plus utilisées pour quantifier les médicaments biologiques sont celles utilisant la spectrométrie de masse et les méthodes immunologiques (Arakawa et. al., 2009; Tang et. al., 2004; Vugmeyster, 2012).

La spectrométrie de masse permet de quantifier et/ou reconnaître la séquence d'une protéine se trouvant dans un échantillon après une préparation de ce dernier. En effet, en reconnaissant la masse de fragments protéiques, cette méthode est utilisée pour reconstituer la séquence des acides aminés d'une protéine recherchée dont on possède un étalon. Les méthodes immunologiques utilisent des anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine d'intérêt et comprennent, entre autres, les essais immuno-enzymatiques (ELISA) et les immunobuvardages de type western (section 2.1). Le maintien de l'intégrité de la protéine lors de la manutention des échantillons, la détection des produits de dégradation, la simplicité de l'expérience, et les coûts, sont des éléments à prendre en considération pour caractériser ou analyser.

1.3.2 Pharmacocinétique

Pour exercer son effet anti-cancer dans un organisme, les propriétés pharmacocinétiques de Mad1*DNKR doivent lui permettre de rester intact assez longtemps pour s'accumuler dans le tissu affecté et atteindre sa cible.

Les mécanismes de biodistribution d'une protéine diffèrent de ceux des petites molécules qui diffusent généralement dans tout l'organisme en fonction de ses propriétés biologiques et physico-chimiques. Les protéines ne peuvent traverser les membranes cellulaires et les tissus par diffusion. Leur taille et leur polarité les contraignent à emprunter la circulation

sanguine ou lymphatique pour atteindre leur cible. Elles se distribuent par voie interstitielle ou, plus rarement, par voie transcellulaire par des processus cellulaires actifs (Baumann, 2009; Meibohm, 2013; Sutradhar et.al., 2011; Tang & Meibohm, 2006; Vugmeyster, 2012). Elles atteignent l'espace interstitiel par les pores para-cellulaires des capillaires, puis sont réabsorbées par gradient osmotique dans le système lymphatique qui les renvoie à la circulation sanguine (Figure 10). Un autre mécanisme probablement emprunté par Mad1*DNKR est la migration transcellulaire par endocytose, c'est-à-dire, l'internalisation du côté vasculaire, puis l'externalisation du côté interstitiel (Figure 10). D'ailleurs, il fut démontré que Max* pénètre par endocytose médiée par la clathrine, mécanisme impliqué dans l'absorption non-spécifique médiée par récepteur (Figure 10). Toutefois, puisque ces b-HLH-LZ tronqués se retrouvent ultimement dans le noyau, ils évitent la dégradation lysosomale en s'échappant des endosomes (Beaulieu et al., 2019; Montagne et al., 2012). La durée de vie de notre molécule dans l'organisme, représentée par la demi-vie, nous informe sur sa stabilité et la vitesse de sa répartition dans les organes. Il existe différents modèles mathématiques pour établir ce paramètre. Par exemple, le modèle mono-compartmental considère l'organisme comme un seul compartiment dans lequel le médicament entre et sort à des vitesses particulières. Ceci est plausible lorsqu'il n'y a pas d'entraves particulières à la distribution, mais difficilement applicable aux protéines thérapeutiques. Dans le modèle pharmacologique bi-compartmental, le sang et les tissus sont considérés comme deux compartiments. Dans un premier temps, la concentration d'un composé injecté directement dans la circulation sanguine diminuera rapidement en se répartissant dans les tissus (phase de distribution), considérés comme un deuxième compartiment (Figure 11). Dans un deuxième temps, les échanges bidirectionnels entre la circulation et la périphérie atteignent un pseudo-équilibre et la concentration sanguine diminue en fonction des différentes constantes propre à chaque mécanisme d'élimination, soit le métabolisme ou l'excrétion (Meibohm, 2013; Tang & Meibohm, 2006).

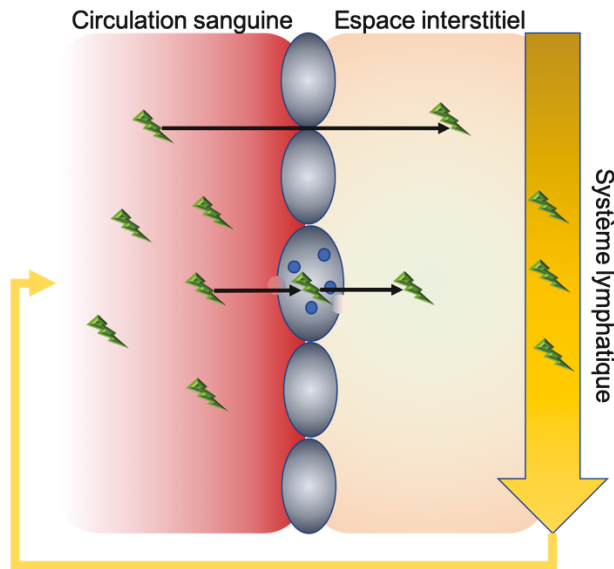


Figure 10. Mécanismes de distribution empruntés par les protéines thérapeutiques

De par le haut poids moléculaire, les protéines ne peuvent pas diffuser à travers les membranes biologiques. Elles peuvent entrer dans l'espace interstitiel des organes par voie para-cellulaire (flèche en haut) ou par transport trans-cellulaire médié par l'endocytose (flèche du milieu). Pour retourner dans le compartiment sanguin, les macromolécules sont convoyées par le système lymphatique (Adapté et traduit à partir de: Meibohm, 2013; No. Licence: 4653620251570).

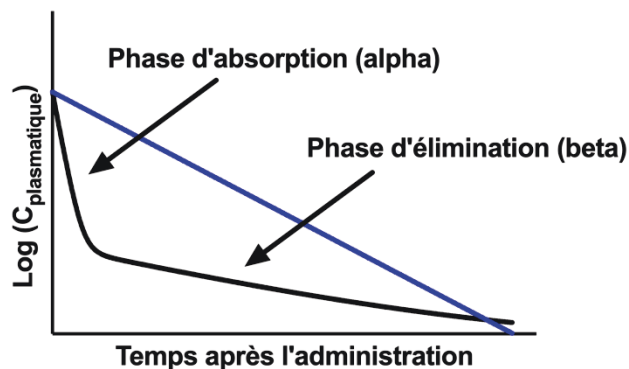


Figure 11. Modèles pharmacocinétiques mono-compartmental et bi-compartmental

Ces graphiques illustrent la diminution exponentielle monophasique (courbe en bleu) ou biphasique (courbe en noir) de la concentration d'un composé administré par injection intraveineuse d'un bolus, en fonction du temps.

D'ailleurs, puisqu'ils sont similaires aux composantes de l'organisme, les médicaments biologiques sont éliminés par les mêmes voies que les protéines endogènes. En comparaison, la majorité des petites molécules sont métabolisées par voies enzymatiques oxydatives et/ou excrétées, inchangées ou sous forme de métabolites, par la voie urinaire ou hépatique. Les produits de dégradation d'une protéine sont difficilement identifiables puisqu'elles sont lysées non-spécifiquement en acides aminés, ultimement recyclés. Les enzymes protéolytiques qui en sont responsables se retrouvent dans tous les compartiments de l'organisme. Le sang contient de nombreuses protéases, comme les enzymes de la cascade de coagulation, ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, qui peuvent dégrader des agents thérapeutiques hormonaux comme l'insuline.

Le foie contient de nombreuses protéases intracellulaires qui peuvent dégrader des protéines circulantes reconnues plus ou moins spécifiquement. Le passage d'une protéine thérapeutique dans les organes d'élimination habituels, le foie et les reins, dépend notamment de sa taille. (Meibohm, 2013; Tang & Meibohm, 2006).

Pour étudier les paramètres pharmacocinétiques d'une molécule, des essais *in vivo* ou *ex vivo* sont mis en œuvre (Sections 2.3 et. 2.4).

1.3.3 Pharmacodynamie

La pharmacodynamie entre en jeu lorsque l'agent thérapeutique peut agir sur sa cible dans l'organisme. Dans le cas des b-HLH-LZ optimisés, la séquence de localisation nucléaire (section 1.2.2) est la caractéristique qui permet d'atteindre c-Myc et Max dans le noyau des cellules cancéreuses ou non. Ainsi, il est impératif de préserver cette propriété à travers les mutations faites pour améliorer son efficacité. Ces mutations ont pour dessein d'accentuer la spécificité du b-HLH-LZ avec Max et l'ADN, assez pour qu'il déloge c-Myc des séquences où la liaison est non-spécifiques sans trop affecter la liaison sur les séquences E-box. Pour améliorer l'affinité de Mad1*DNKR à sa cible c-Myc, plusieurs mutations ont été faites de manière rationnelle en investiguant les interactions moléculaires entre les deux facteurs de transcription.

La démonstration de l'efficacité *in vitro* d'un composé est insuffisante pour inférer son efficacité en conditions physiologiques réelles. Il faut donc utiliser un modèle animal pour prouver son efficacité.

Les thérapies ciblant c-Myc à l'aide de protéines sont étudiées par les groupes de Evans et Soucek depuis une dizaine d'années. Ils ont conçu génétiquement plusieurs modèles animaux dont les tumeurs présentent les mutations rencontrées dans les cancers étiologiquement liés à c-Myc. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte pour le choix d'un modèle particulier : la faisabilité, l'accessibilité et l'expertise.

La collaboration avec le Pr. Lepage ajoute au projet une expertise en expérimentation animale grâce à Dina Sikpa et Réjean Lebel. Bien que c-Myc soit une cible dérégulée dans de nombreux cancers, le modèle utilisé doit correspondre à la maladie visée. Un des types de cancer sur lesquels l'équipe du Pr. Lavigne a fait ses expériences *in vitro* est le cancer du poumon non à petites cellules, un cancer dans lequel le récepteur à l'EGF ou la protéine K-RAS est fréquemment mutés (Annibali et al., 2014; Kalkat et al., 2017; Soucek et al., 2013). En clinique, il est aussi fréquent de retrouver d'autres protéines de la voie des MAPK avec des mutations (Figure 3) (Santarpia et al., 2012; Sears et al., 2000). Pour un modèle animal de cancer, la correspondance à respecter pour le développement de Mad1*DNKR est la sur-activation de c-Myc par une expression dérégulée et une stabilisation accrue.

1.3.4 Immunogénicité

Le système immunitaire reconnaît les organismes étrangers pour s'en défendre au niveau cellulaire et moléculaire (Parham Peter, 2014). Il reconnaît comme « autre » une protéine d'un pathogène (ou d'un allergène), ou une composante ne se retrouvant pas normalement dans le compartiment interstitiel ou sanguin. Les agents biologiques n'y font pas exception. Justement, le principe des vaccins inactivés est d'engendrer une réaction immunitaire contre une protéine particulière. Ainsi, l'immunogénicité est un problème propre aux médicaments biologiques. La maladie du sérum, en réaction à l'injection de sérums d'animaux immunisés, est un des plus vieux exemples de réaction immunitaire à un médicament biologique. L'humanisation des anticorps monoclonaux, où l'on greffe la

région de reconnaissance spécifique produite à une charpente d'immunoglobuline humaine, fut un des principaux progrès en la matière (Schellekens & Jiskoot, 2013).

Même avec des protéines recombinantes humaines, une réaction amoindrie est souvent rencontrée. En effet, un mécanisme distinct des réactions d'hypersensibilité cause la production d'anticorps avec peu d'effets biologiques (Schellekens & Jiskoot, 2013). Plutôt qu'une sensibilisation à un épitope étranger, celui-ci serait plutôt dû à une perte de la tolérance des lymphocytes B face à ces protéines humaines. Elle présenterait un profil temporel différent de la réaction type vaccin. Sans déclencher de réponse immunitaire, ces anticorps peuvent augmenter drastiquement la clairance de l'agent thérapeutique et ainsi réduire l'efficacité du traitement (Baumann, 2008, 2009; Vugmeyster, 2012). La réponse immunitaire face à une protéine recombinante peut être causée entre autres par quelques acides aminés d'une séquence immunogène, des modifications post-transcriptionnelles, des contaminants, ou la formation d'agrégats par la protéine elle-même. L'espèce de provenance augmente potentiellement l'immunogénicité, mais cela n'est pas catégorique (Schellekens & Jiskoot, 2013; Vugmeyster, 2012).

1.3.5 Toxicologie

La toxicologie d'un médicament est une dimension importante de son développement. Une variété impressionnante de paramètres physiologiques peut être pris en compte, mais un souci particulier quant au nombre d'animaux utilisés doit être appliqué. Tout d'abord, une expérience sert à déterminer l'écart des doses, soit en une seule administration, soit en plusieurs administrations sur quelques jours, avec une espèce pertinente au niveau pharmacologique, c'est-à-dire susceptible de répondre à l'agent en développement (Vugmeyster, 2012). Cette donnée est cruciale pour déterminer les doses étudiées dans les essais *in vivo* subséquents. La toxicologie peut être explorée de différentes manières, autant sur l'état général que sur des paramètres physiologiques particuliers (Vargas et. al., 2013). Certaines expériences toxicologiques peuvent aussi être couplées à des essais pharmacocinétiques ou pharmacodynamiques si des effets sont recherchés au niveau histologique. La toxicité est souvent reliée à l'effet pharmacologique attendu vu la

spécificité particulière des agents biologiques (Vugmeyster, 2012). Par exemple, les effets indésirables de l'inhibition de c-Myc sur différents tissus et paramètres physiologiques furent analysés lors des études de preuve de concept (Beaulieu et al., 2019; Soucek et al., 2008, 2013b). Les changements remarquables, soit la baisse de prolifération des cellules dans les tissus à haut taux de renouvellement (p. ex. épithélium intestinal, tubules séminifères, cellules sanguines), est en lien direct avec l'effet pharmacologique recherché.

1.4 Projet de maîtrise

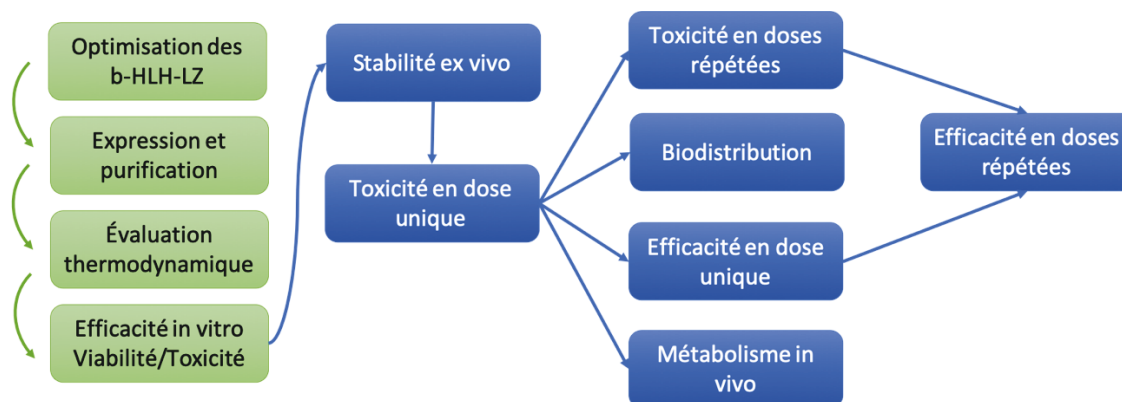


Figure 12. Séquence du développement des b-HLH-LZ optimisés.

Les étapes en vert ont déjà été réalisées au laboratoire de Pr. Lavigne, les étapes en bleu constituent les étapes de ce projet de maîtrise.

La figure 12 représente la séquence de travail du projet de maîtrise. Les étapes en vert représentent le processus de développement des analogues de b-HLH-LZ ayant pris forme à partir de la recherche fondamentale du Pr. Lavigne. Tout d'abord, les nouvelles molécules sont conçues en déterminant des mutations de la séquence pouvant améliorer l'inhibition de c-Myc. Ces protéines sont alors produites en bactéries puis purifiées. Ensuite, les propriétés biochimiques et thermodynamiques de la protéine sont caractérisées. Si son interaction avec c-Myc, Max, et/ou l'ADN est améliorée par les modifications, elle est testée dans des lignées cellulaires. Mad1*DNKR et Max* sont deux candidats qui avaient traversé ces étapes lors du début de ce projet de maîtrise.

Les étapes en bleu représentent les expériences précliniques nécessaires à l'avancement vers une nouvelle thérapie (Section 2, Méthodes). Une fois la stabilité plasmatique *ex vivo* déterminée, l'essai de toxicité mesure l'écart des doses maximales et non-toxiques. Les expériences suivantes sont effectuées avec la ou les doses trouvées. La toxicité en doses répétées vise à évaluer les potentiels effets secondaires de plusieurs administrations. L'expérience de biodistribution nous informe sur le devenir du composé dans l'organisme en mesurant la présence du composé dans différents organes. Cette information indique potentiellement les cancers pouvant être exposé à une concentration efficace selon l'organe. Par exemple si Mad1*DNKR est détecté dans les poumons, le traitement pour le cancer du poumon serait une option, et les modèles animaux subséquents pourraient être inspirés de cette information. Le test de métabolisme a pour objectif de mesurer la demi-vie biologique de Mad1*DNKR lorsqu'il est injecté à l'animal inconscient, dans un écart de temps suggéré par l'expérience de stabilité plasmatique *ex vivo*. Finalement, les tests d'efficacité ont pour but de montrer l'efficacité du composé pour faire régresser des tumeurs en administrant le peptide sur un modèle animal, avec les posologies évaluées précédemment (Baumann, 2008, 2009).

Puisqu'il s'agit d'une première au sein des deux laboratoires, l'objectif global était de mettre au point une méthodologie pour la validation préclinique des b-HLH-LZ avec les ressources matérielles et humaines disponibles au sein de l'équipe de travail. Nous avons donc mis au point les expériences mentionnées dans le but de déterminer les paramètres pharmacocinétiques de Mad1*DNKR et son efficacité à faire régresser les tumeurs. Ce processus a permis de jeter les bases d'une collaboration soutenue dans le développement d'agents anti-cancer innovants.

L'hypothèse du projet est que les b-HLH-LZ optimisés Mad1*DNKR et Max*, sont des candidats prometteurs pour une thérapie anti-cancer ciblant c-Myc. Pour avancer Ils devraient donc présenter des caractéristiques pharmacocinétiques avantageuses (demi-vie et biodistribution) pour un traitement et être efficaces pour freiner la croissance de tumeurs dans un modèle animal.

2. Méthodes

2.1 Développement de méthodes de détection

2.1.1 ELISA

La méthode immuno-enzymatique *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) est fréquemment utilisée pour quantifier des protéines. Elle serait appropriée pour détecter Mad1*DNKR ou Max entières dans les échantillons biologiques des expériences pharmacocinétiques. Notre essai devait mesurer Mad1*DNKR ou Max* sous forme intacte. L'influence des protéines partielles, digérées, était inconnue dans le signal mesuré. Nous voulions mesurer Mad1*DNKR dans le PBS (*Phosphate Buffered Saline*), le plasma de souris commercial (Innovative Research, plasma de souris balb/c), le plasma extrait du sang d'une souris balb/c utilisée dans les expériences de pharmacocinétique, et des extraits protéiques d'organes (cerveau, poumons, foie, reins, intestins, tumeurs). Parmi toutes les protéines des échantillons biologiques, nous avons anticipé détecter 0,1% de la dose administrée dans un organe dont le poids est 1% celui de l'animal. Ceci était une limite inférieure d'intérêt établie selon l'expérience pratique de Réjean Lebel. Pour une dose de 25 mg/kg administrée à une souris de 20 g, avec un rein de 0,2 g, cela signifie une concentration de 1 µg/mL extrait dans 5 mL de tampon. L'anticorps anti-Mad-DV (Immune Biosolutions) que nous avons utilisé détecte les analogues de Mad1*DV, un b-HLH-LZ de Mad1 à partir duquel Mad1*DNKR est conçu. Pour Max*, nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris qui détecte le b-HLH-LZ de Max p21 (Max antibody H-2 sc8011, Santa-Cruz). La détection de nos protéines n'était probablement pas être affectée par les protéines Maxp21 et Mad1 endogène de l'animal, vu leur faible concentration. Nous cherchions à détecter des concentrations entre 1 mg/mL et 1 µg/mL et nous voulions que la plus faible concentration émette un signal équivalent au double de celui du contrôle négatif. Pour la détection, nous avons d'abord essayé un réactif chimioluminescent utilisé normalement pour les immunobuvardages de type Western (SignalFire™ ECL Reagent #6883). Ensuite, nous avons utilisé un réactif colorimétrique, l'OPD (o-Phenylenediamine) (Sigma Aldrich) (He, 2013).

Nous avons testé deux types d'ELISA pour Mad1*DNKR (Figure 15), soit l'ELISA indirect et l'ELISA sandwich. Dans l'ELISA indirect l'échantillon Mad1*DNKR était d'abord adsorbé au fond des puits d'une plaque. Cette méthode est couramment utilisée pour détecter des anticorps présents dans un sérum (p. ex. pour mesurer la présence d'une réponse immunitaire à un agent biologique). Nous l'avons délaissé suite à l'obtention d'un second anticorps contre Mad, l'anticorps de souris anti-Mad1 polyclonal de Fisher. Ce dernier, dans l'ELISA sandwich, a servi d'anticorps « de capture » car il est adsorbé au fond de la plaque pour séparer la protéine d'intérêt du reste de l'échantillon analysé. Ensuite, la protéine d'intérêt est détectée à l'aide d'une paire d'anticorps. L'anticorps de détection (ou primaire), Anti-Mad1-DV, est un anticorps de poulet polyclonal (reconnaissant plusieurs épitopes) développé par Immune Biosolutions (cet anticorps sera désigné anti-Mad ou anti Mad1*DNKR.) Le second anticorps, alpaga anti-poulet-IgY-HRP (Immune Biosolutions), est un anticorps polyclonal, dit « secondaire » ou « de révélation ». Il détecte l'anticorps de détection et couplé à l'enzyme peroxydase de raifort (HRP pour *Horseradish peroxydase*) responsable du signal mesuré en proportion avec la quantité de Mad1*DNKR.

Anticorps de capture →	Mouse – αMxd : 1:10'00 / 1:15'000 / 1:20'000												
Anticorps primaire →	αMad 1:1000	αMad 1:2500	αMad 1:5000	αMad 1:1000	αMad 1:2500	αMad 1:5000							
Anticorps secondaire →	Alpaca α-chicken- IgY-HRP 1:20'000												
Contrôle positif →	Mad1* : 5ug/mL	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
	Mad1* : 1ug/mL	B1	B2										
Courbe standard →	Mad1* : 0,5ug/mL	C1											
	Mad1* : 0,1ug/mL	D1											
	Mad1* : 0,05ug/mL	E1											
Contrôle négatif →	0	F1											
	Mad1* : 0,5ug/mL + plasma	G1											
Contrôles en présence de contaminants →	0 + plasma	H1											

Figure 13. Diagramme de titrage pour le développement d'un ELISA sandwich

Après l'adsorption du premier réactif dans un puits, nous utilisons un mélange de protéines inertes (lait écrémé 10%, albumine sérique bovine 1%) comme solution de blocage. Cela a pour but de saturer les régions à découvert et éviter les interactions indésirables entre les autres réactifs et la plaque. Bien entendu, entre chaque ajout de réactif, la plaque était rincée avec la solution tampon des anticorps (PBS) enrichie d'un détergent (Tween-20) pour défaire toute adhésion non-spécifique de protéines et favoriser les liaisons les plus fortes. Finalement, un réactif colorimétrique ou luminescent était ajouté dans les puits pour que l'enzyme HRP de l'anticorps secondaire produise un signal proportionnel à la quantité de protéine liés aux anticorps. Nous avons d'abord utilisé un substrat luminescent dédié à la révélation des immunobuvardages de type Western. Nous avons opté pour un réactif colorimétrique plus tangible, l'ortho-phénylènediamine pour de meilleurs résultats. Le développement d'un essai ELISA débute par la titration des réactifs pour déterminer les concentrations à utiliser pour détecter Mad1*DNKR (Figure 13) Comme contrôle, nous avons aussi utilisé un échantillon de plasma de souris et d'inhibiteurs de protéases pour simuler nos futurs échantillons.

2.1.2 Immunobuvardage de type Western

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide avec Sodium-Dodécyl Sulfate (SDS-PAGE) et l'immunobuvardage de type Western de sont des techniques usuelles en biologie cellulaire et moléculaire (Figure 14). On s'en sert pour détecter une protéine d'intérêt dans un échantillon à l'aide d'anticorps et la quantifier relativement à un standard. Il y a autant de variations sur la méthode qu'il y a d'utilisateurs chevronnés. Le SDS-PAGE sépare les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Cela nous permet donc de distinguer un fragment digéré de Mad1*DNKR.

Nous avons caractérisé Mad1*DNKR avec la moitié de la quantité usuelle (entre 5 et 10 μ L) de chaque échantillon dans les puits du gel afin que la concentration de protéines dans le gel n'affecte pas la migration. L'excès de protéines dans les échantillons biologiques affectait l'électrophorèse au point où les bandes de standard adoptent une apparence largement différente, probablement en offrant résistance au courant électrique qui

traverse le montage. Les autres paramètres de l'expérience, comme la tension, les anticorps, les réactifs bloquants, ont été explorés dans une optique d'optimisation.

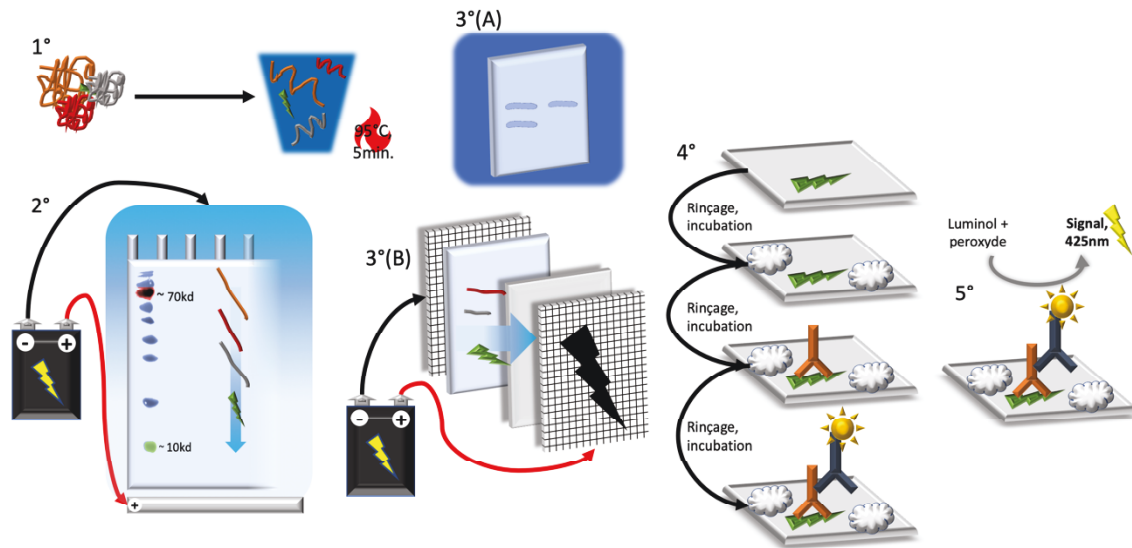


Figure 14. Schéma d'un SDS-PAGE et d'un immunobuvardage de type Western :

- 1° Dénaturation des protéines à l'aide du Laemmli-Urée, procurant une charge négative proportionnelle à la taille.
- 2° Migration des protéines dans le gel de polyacrylamide en fonction de la longueur grâce à un potentiel électrique.
- 3° (A) Les bandes de protéines peuvent être teintées en bleu pour observation directe. (B) Transfert des protéines du gel au buvard à l'aide d'un potentiel électrique.
- 4° Blocage des sites libres de la membrane et incubation des anticorps.
- 5° Détection des protéines par une réaction enzymatique.

L'outil utilisé pour la révélation des bandes de protéines dépend de l'objectif visé. Le film photographique est suffisant pour une évaluation qualitative, mais présente des limites au niveau quantitatif car la saturation du signal n'est pas facilement détectable. Si l'exposition est trop longue, la saturation du film ou du détecteur empêche la quantification. Un appareil d'imagerie chimioluminescente comprenant une caméra CCD (closed coupled device) à haute performance, le Fusion-Pulse SOLO-S (Analis), permet de mesurer la durée d'exposition nécessaire pour éviter la saturation du signal chimioluminescent. Cela

permet d'assurer que les intensités des bandes de protéines soient distinctes. Si l'une d'elles est trop intense par rapport aux autres et qu'il y a saturation, il est possible de refaire l'expérience en diluant l'échantillon concentré. À l'inverse, avec un film radiographique, on ne peut savoir s'il y a saturation en captant les photons de la réaction enzymatique. Les valeurs inférieures peuvent donc être faussement rapprochées des valeurs supérieures si la noirceur et l'épaisseur d'une bande dépasse la réponse linéaire du film. Le logiciel mesure aussi l'exposition nécessaire pour détecter suffisamment les plus petites valeurs sur le gel. Il est possible de sélectionner une région de la membrane où un échantillon faiblement concentré nécessiterait une plus longue exposition pour être mesuré. Un jeu de dilution s'ensuit pour que toutes les mesures soient dans l'écart d'intensité mesuré par le logiciel pour un immunobuvardage particulier.

Moins précise pour quantifier que l'ELISA, la méthode d'immunobuvardage de type Western est appropriée pour déterminer la demi-vie plasmatique de Mad1*DNKR et Max*. La diminution du signal entre les bandes est suffisante pour calculer cette valeur car les échantillons étaient prélevés séquentiellement dans le même compartiment. De plus, elle permet de discerner le produit de dégradation de Mad1*DNKR. L'analyse des images résultantes a été faite avec les outils de densitométrie d'ImageJ (Gassmann et. al., 2009; Taylor et. al., 2013). L'intensité des bandes en fonction du temps a été ajustée par une courbe de dégradation mono-exponentielle (logiciel GraphPad Prism) pour déterminer la demi-vie.

Pour évaluer la biodistribution de Mad1*DNKR, les concentrations dans les tissus ne sont pas directement reliées comme dans le compartiment sanguin. La méthode requiert une courbe standard pour mesurer les concentrations elles-mêmes, plutôt que leur variation. C'est là qu'a débuté une série d'itérations où chaque paramètre de l'immunobuvardage et du SDS-PAGE était modifié dans le but d'optimiser la détection.

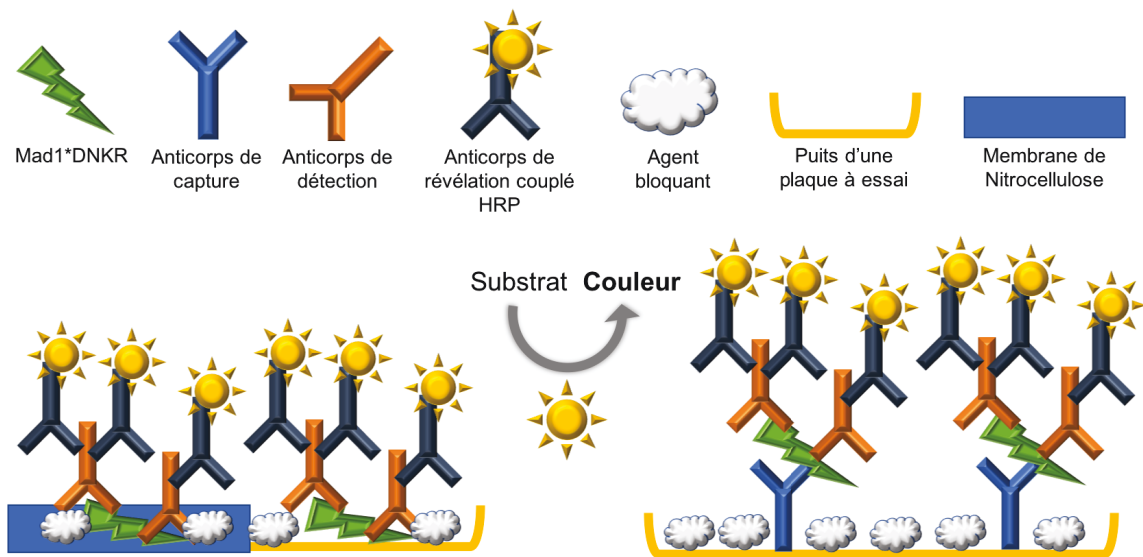


Figure 15. Méthodes de détection immunologique.

Le montage des trois méthodes de détection développées est composé du support (membrane ou plaque), de la protéine détectée, des anticorps utilisés, et de l'agent bloquant.

En bas à gauche : l'immunobuvardage de type Western et l'ELISA indirect ont un montage similaire. En bas à droite : l'ELISA sandwich se distingue par l'utilisation d'un anticorps de capture.

2.2 Détermination de la dose maximale tolérée

Avant d'évaluer l'efficacité *in vivo* de Mad1*DNKR, nous voulions déterminer l'écart de doses que l'on peut administrer par voie intra-veineuse sans compromettre l'expérience par une toxicité inattendue. Un titrage en fonction des signes de toxicité nous a révélé la dose maximale tolérable, puis nous avons vérifié l'innocuité de celle-ci en administrations répétées. Il est à noter que le seul mode d'administration que nous avons utilisé pour nos protéines est l'injection intraveineuse par la veine caudale.

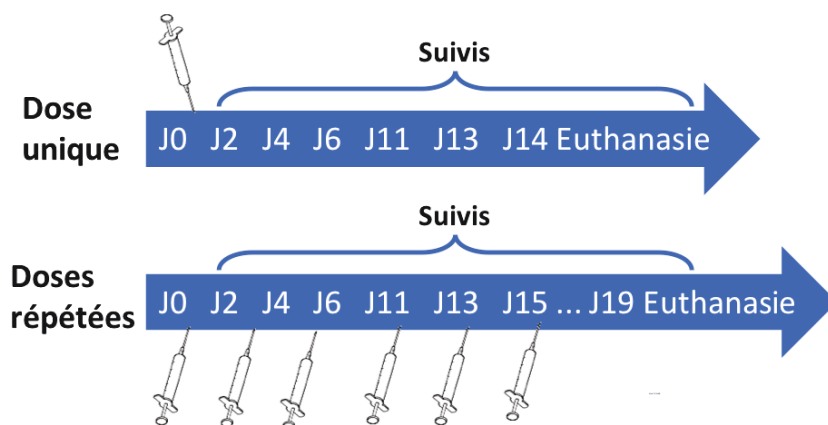


Figure 16. Séquence des expériences de toxicité

Nous avons déterminé la toxicité en observant les signes de détresse de l'animal dans les heures et les jours qui suivaient l'administration d'une dose (Figure 16). Cela présupposait que les souris expriment une dysfonction interne par des signes physiques ou comportementaux. (Zhang et. al., 2015). Le Tableau 1 montre les signes et comportements supposés témoigner de la souffrance des souris, que nous avons évalué avec un score entre 0 et 3 puis additionnons. (Olfert et al., 1998). Un score de 3 pour un critère ou une somme de 8 signifie que la dose est toxique. Nous avons réalisé l'expérience avec des souris CD-1 (variété albinos non-consanguine tout-usage avec une bonne diversité génétique) offertes par l'animalerie du CHUS. Après l'escalade des doses, nous avons administré la dose maximale tolérée à des souris Balb/c (variété albinos consanguine utilisé régulièrement comme modèle de cancer), variété utilisée dans les expériences suivantes. Les doses étaient préparées en fonction du poids de chaque animal, en commençant à 0,0125 mg/kg. En l'absence de signes de détresse, une autre souris recevait une dose trois fois plus grande que la précédente. À chaque suivi étaient inscrits la date et l'heure, le poids de l'animal, le pointage de chaque signe, et le score total. La dose inférieure à celle qui entraînait les points limites des signes évalués était définie comme la dose maximale tolérée (MTD).

Tableau 1. Critères de détermination de souffrance de la souris.

Catégorie	Signe	Description
Général	Perte de poids	Perte de poids de plus de 20%
Apparence physique	Absence de toilettage	Pelage non entretenu est gras et « mottoneux »
	Posture voutée	Semble recroquevillée, a le ventre surélevé, et le dos arqué, démarche plus laborieuse.
	Décharges au niveau des yeux et du nez	Petites croutes blanches, jaunes ou verte sur le museau
	Taches d'urines ou de fèces	Pelage au niveau des organes génitaux taché par les excréments
	Fermeture des yeux	Retrousse le museau et ferme les yeux
	Extrémités colorées	Pattes et museaux pâle, rouge, ou bleu
Comportement	Apathie	Intolérance à se déplacer, ne creuse pas, renifle moins l'environnement
	Vocalisations	Émet des petits cris stridents plus ou moins longs
	Absence d'interactions	Évite les autres souris, ne les renifle plus et ne les suis plus
	Tremblements	Soubresauts et frissons spontanés
	Hyperactivité	Comportement erratique et courses tumultueuses
	Réponse aux stimuli	Curiosité envers l'expérimentateur, réagit lorsque touché ou dérangé
Excréments	Diarrhée	Selles molles ou liquides
	Sang dans les fèces ou les urines	Excréments ou litière rougeâtre

Pour l'expérience de toxicité en doses répétées, trois souris CD-1 et trois Balb/c ont reçu la dose maximale tolérée à six reprises sur deux semaines. La grille d'évaluation était ajustée en fonction des signes observés dans l'expérience précédente. L'assistance d'un manipulateur expérimenté pour la canulation était requise puisque la queue de l'animal devenait de plus en plus endommagée.

2.3 Stabilité métabolique

La stabilité d'un médicament dans les fluides biologiques est une information primordiale lors du développement préclinique. Les expériences suivantes cherchaient à investiguer le sort de Mad1*DNKR dans le plasma de souris Balb/c afin de l'optimiser dans les futures itérations de la molécule.

2.3.1 Demi-vie plasmatique *ex vivo*

La stabilité plasmatique fut d'abord étudiée *ex vivo* pour Mad1*DNKR et Max. La quantité utilisée correspondait à la concentration sanguine suivant l'administration d'une dose de 0,125 mg/kg considérant qu'une souris de 25 g contient 2 mL de sang. La protéine a été incubée dans le plasma de Balb/c à 37°C pour mimer les conditions physiologiques. Des portions du plasma incubé ont été prélevées à des temps graduellement espacés, puis aussitôt mélangées à du Laemmli-Urée pour inactiver les enzymes et arrêter la dégradation. Ces échantillons ont ensuite été analysés avec la méthode d'immunobuvardage de type Western détaillée à la section 2.1.2 pour déterminer le temps de dégradation de la protéine.

2.3.2 Détermination du site de clivage

Une variation de l'expérience nous a permis de connaître la position exacte du premier site de clivage de Mad1*DNKR. Après la digestion et l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide contenant les protéines est coloré au bleu de Coomassie afin de cerner la bande de protéine correspondant à Mad1*DNKR entier, ou celle due au fragment clivé (Figure 17). Ces bandes furent découpées du gel puis analysées par spectrométrie de masse chez Phenoswitch Bioscience. Leur procédure début par l'extraction des protéines des bandes de polyacrylamide. Les protéines d'intérêt sont déshydratées, acétylées (pour éviter la formation de ponts disulfures), puis digérées par une enzyme protéolytique pour cartographier la masse des fragments générés en spectrométrie de masse. Un appareil de chromatographie liquide et de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS ou *Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry*) (Patent N° WO 2017/185171 A1, 2017). De manière simplifiée, cet appareil sépare d'abord les composantes de l'échantillon par chromatographie, puis les injecte dans la chambre à vide du spectromètre de masse. Dans cette chambre à vide, les fragments de protéine sont ionisés et propulsés vers un détecteur par un champ magnétique. Leur masse, qui affecte leur vitesse, est mesurée selon le temps de vol au travers du compartiment à vide jusqu'au détecteur. Différents logiciels et algorithmes permettent d'identifier les protéines d'un échantillon, de la quantifier, et d'en

identifier la séquence, ce que les opérateurs de PhenoSwitch Biosciences ont fait pour nous avec Mad1*DNKR. Cette méthode est couramment utilisée pour la caractérisation à haut débit de protéines thérapeutiques en développement (Chambers, 2013; G. Chen, 2013). Après avoir analysé nos échantillons, la compagnie PhenoSwitch biosciences nous a remis un rapport d'analyse (Section 3.3.2).

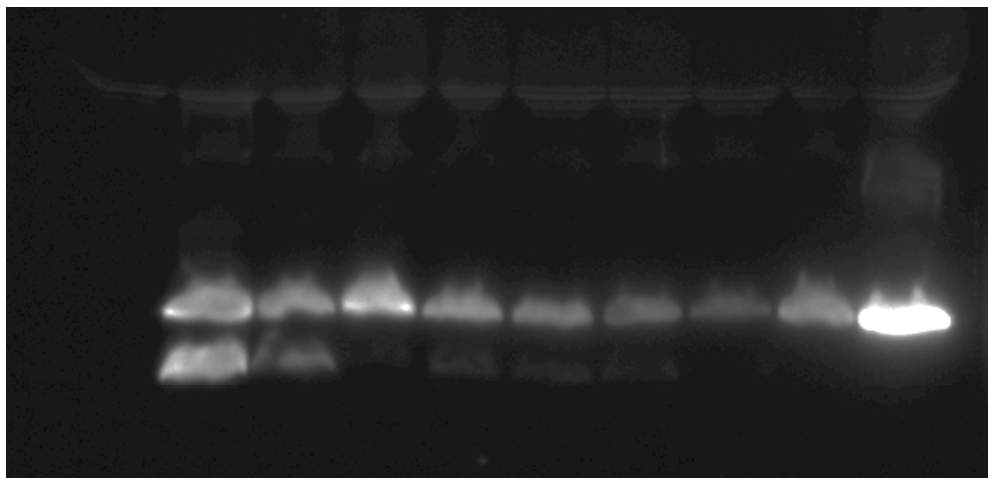


Figure 17. Distinction des bandes de Mad1*DNKR et son produit de dégradation ;

Sur cette photographie provenant d'un Immunobuvardage de type Western d'une expérience de pharmacocinétique (Section 3.4.2), la luminosité est augmentée afin que les deux bandes correspondant à Mad1*DNKR (flèche A) et son produit de dégradation (flèche B) soient bien visibles.

2.4 Pharmacocinétique *in vivo*

2.4.1 Demi-vie biologique

L'expérience de pharmacocinétique *in vivo* visait à mesurer la demi-vie de notre composé dans le sang d'une souris vivante. Ce paramètre est désigné « demi-vie biologique » puisqu'il prend en compte la distribution de la protéine dans les tissus de l'animal.

La Figure 18 illustre la procédure générant les échantillons de l'expérience de métabolisme *in vivo*. L'animal était endormi à l'isoflurane 2% dans une cage jusqu'à ne plus avoir de réflexes, puis transféré sur la paillasse avec une buse pour maintenir l'anesthésie. Il était canulé dans la veine caudale pour l'injection du composé, et dans l'artère carotidienne pour

les prélèvements sanguins. Nous prélevons le sang en pipetant lentement le volume désiré dans le socle de l'aiguille sur la canule carotidienne, au rythme du débit artériel, pour éviter d'aspirer de l'air et mousser le sang. Un échantillon de sang prélevé avant l'injection de Mad1*DNKR servait de contrôle négatif. La minuterie démarrait après l'injection et servait de repère visuel pour les prélèvements, à différents temps (~30 secondes, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 minutes). Aussitôt pipeté, 45 μ L de sang étaient mélangés, dans un tube à essai sur glace, à 5 μ L d'EDTA (15 mg/mL) pour empêcher la coagulation. Au plus 250 μ L de sang pouvaient être retirés d'une souris sans trop altérer son métabolisme. Le dernier prélèvement excédait cette quantité car l'animal était alors euthanasié par exsanguination. Les prélèvements d'organes étaient réservés à une autre expérience pour éviter l'impact du sang retiré sur la biodistribution. Les prélèvements sanguins étaient ensuite centrifugés à 1500 G pendant 15 minutes pour séparer le plasma des cellules sanguines. Au final, le plasma était réservé dans des tubes à essai identifiés, puis congelé pour de futures investigations, dont la quantification du composé.

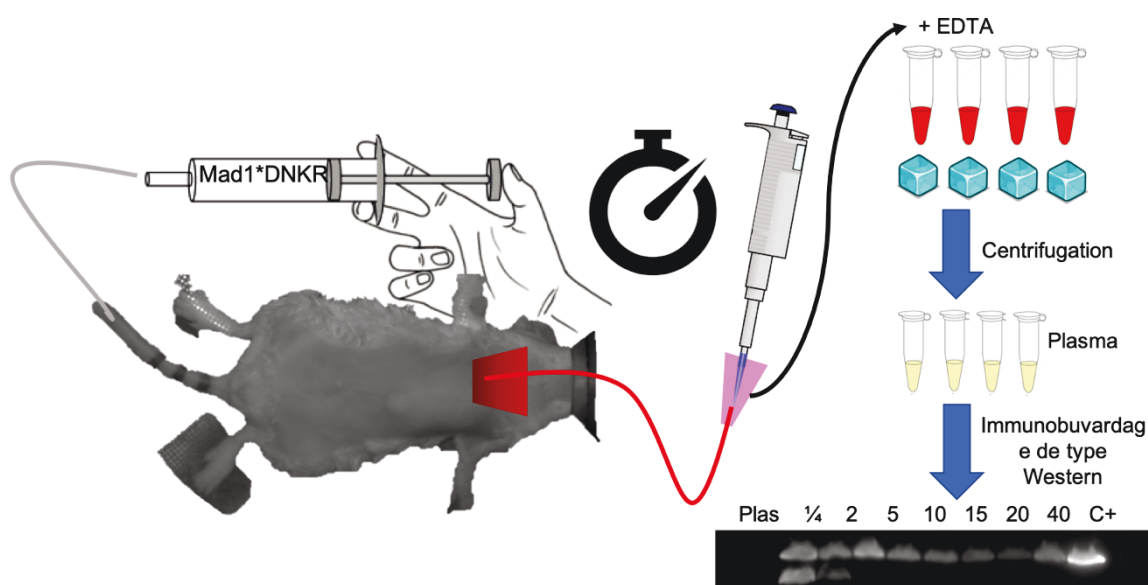


Figure 18. Schéma de l'expérience de demi-vie plasmatique in vivo.

2.4.2 Choix de l'anticoagulant

En absence d'anticoagulant, la centrifugation séparerait plutôt le sérum, soit le plasma sans les éléments coagulants. Pour mesurer Mad1*DNKR à un temps donné, il faut arrêter les protéases sanguines. Ce faisant, on arrête la coagulation. Plusieurs anticoagulants sont disponibles, incluant le citrate, l'héparine, les inhibiteurs de protéases et l'EDTA. Ce dernier chélate les ions divalents essentiels à l'activité enzymatique des métalloprotéases, autant pour la coagulation sanguine que pour digérer Mad1*DNKR. Nous avons confirmé l'efficacité de l'EDTA dans une expérience semblable à celle de stabilité *ex vivo*. Il s'agissait de l'option la moins susceptible d'interagir avec les expériences subséquentes et la plus facile à manipuler. Pour l'injection dans la veine caudale, la saline avec héparine (100 UI/mL) demeurait l'anticoagulant choisi, le risque d'en retrouver dans nos échantillons étant très faible.

2.4.3 Analyse des échantillons

Les échantillons étaient ensuite analysés avec les techniques énumérées à la section 2.1.2. Nous prenions pour acquis que, dans l'écart de valeurs observées, le signal des bandes de Mad1*DNKR variait proportionnellement avec la concentration de Mad1*DNKR. Donc, Modélisé avec Graph pad dans un graphique où le signal est fonction du temps, une courbe de décroissance mono-exponentielle a fourni la demi-vie du produit étudié. L'expérience avec le plasma de souris incubé nous informe sur la demi-vie plasmatique; celle avec l'animal vivant, la demi-vie pharmacocinétique. Dans les prélèvements de quelques souris, il était possible d'observer le produit de dégradation de Mad1*DNKR. Nous pouvions alors étudier la demi-vie de ce produit de dégradation.

2.4.4 Biodistribution

Pour exercer son effet anti-cancer dans un organisme, Mad1*DNKR doit se retrouver en quantité suffisante dans le tissu affecté pour avoir un effet. La biodistribution représente la répartition d'un composé dans un animal. La présente méthode vise à évaluer ce paramètre pharmacocinétique chez la souris Balb/c (Figure 19). Plutôt que l'ensemble des organes, nous avons choisi de mesurer la présence de Mad1*DNKR dans sept organes ou tissus particuliers. Le foie et les reins sont les principaux organes métaboliques. Sa présence dans les poumons est nécessaire pour traiter un cancer dans cet organe, et sa présence dans le cerveau indique qu'il parvient à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). La présence dans les tumeurs sous-cutanées peut affirmer une potentielle efficacité sur le modèle utilisé.

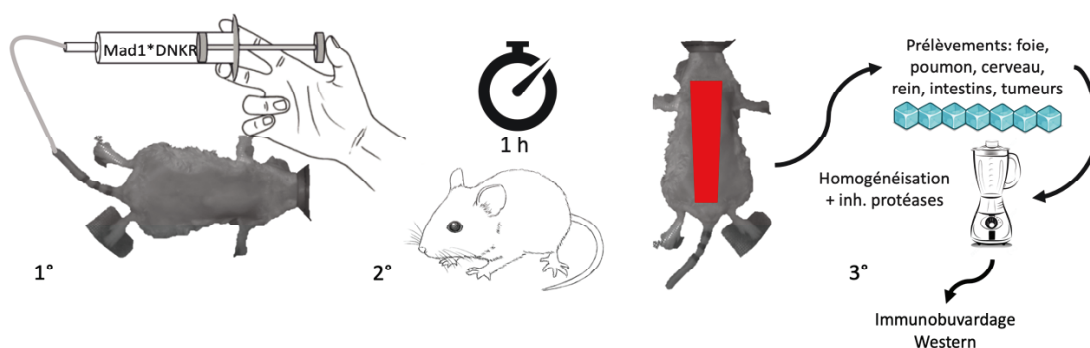


Figure 19. Schéma de l'expérience de biodistribution.

2.4.5 Prélèvement des organes

Après l'administration du composé, l'animal était réveillé pendant 55 minutes. Il était anesthésié et euthanasié par exsanguination exactement à 60 minutes post-injection. Nous prélevions, en plus du sang, un morceau de foie, un segment d'intestin, un rein, les poumons, le cerveau, ainsi que les tumeurs lorsqu'il s'agissait d'un animal contrôle de l'expérience d'efficacité. Chaque organe était immédiatement pesé puis congelé dans l'azote liquide et le temps de prélèvement noté. La procédure excluant l'administration de Mad1*DNKR fournissait les organes contrôles négatifs.

2.4.6 Extraction des protéines des tissus

Pour bien quantifier Mad1*DNKR, il faut extraire, dans une solution, les protéines des organes prélevés sans réactiver les enzymes pouvant digérer le tissu. La première étape est l'homogénéisation dans un tampon d'extraction protéique avec inhibiteurs de protéases. Ce tampon contient des détergents doux qui dissolvent les membranes et préserve l'intégrité des protéines. Le broyage doit désagréger les cellules et les noyaux, où se trouverait Mad1*DNKR. Après centrifugation de l'homogénat à 10 000 g, le surnageant qui contient les protéines solubles peut être analysé plus aisément. Pour uniformiser les manipulations subséquentes, la concentration totale en protéines était dosée par la méthode de Bradford (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™) (Bradford, 1976). Cette méthode de quantification colorimétrique utilise le bleu de coomassie G250, se liant aux résidus arginine et lysine, afin de mesurer par spectroscopie la quantité de protéine en proportion avec l'absorption à une longueur d'onde de 595 nm. Les échantillons étaient ensuite analysés par immunobuvardage de type Western (section 2.1.2).

Nous avons expérimenté deux méthodes pour l'extraction protéique. Dans la première, l'organe entier était pesé, décongelé sur glace, submergé dans le tampon d'extraction (T-PER reagent, ThermoScientific Pierce) dans un rapport 1 :20 m/v. Dans la deuxième, l'organe était pulvérisé dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Nous pouvions ainsi utiliser seulement 50 mg d'organe pour économiser le tampon. Pour désintégrer les cellules, le mélange était homogénéisé avec un sonicateur. Les vibrations ultrasoniques de cet appareil agitent et brisent les organelles cellulaires. L'échantillon est centrifugé puis réservé.

2.4.7 Analyse par immunobuvardage de type Western

Nous avons investigué la présence de Mad1*DNKR dans les organes avec la méthode d'immunobuvardage de type Western. Dans un premier temps, les gels des SDS-PAGE étaient chargés des échantillons d'organes d'une souris traitée et non traitée, ainsi que trois standards de Mad1*DNKR de concentrations différentes. Ces standards étaient incorporés

à du plasma neutralisé pour maintenir l'effet d'un excès de protéines étrangères sur l'électrophorèse (Figure 17). Dans un deuxième temps, les échantillons d'organes présentant une bande au même poids moléculaire que Mad1*DNKR (foie, rein, poumons) étaient chargés dans un gel avec une courbe standard pour tenter de quantifier. Nous laissions deux puits vides entre les échantillons et la courbe standard (sans plasma) pour que tous les échantillons migrent également. Lors de cette manipulation, les paramètres du SDS-PAGE et de l'immunobuvardage de type Western ont été modifiés séquentiellement pour obtenir un signal autant des standards que des échantillons.

2.5 Efficacité

Une fois que l'écart de doses administrables sans effets toxiques est déterminé, il est possible d'administrer nos composés à des animaux malades pour en tester l'efficacité. Le modèle syngénique de cellules bioluminescentes 4T1 avec des souris Balb/c était déjà utilisé par Dina Sikpa, candidate au doctorat dans le laboratoire du Pr Lepage, dans leurs travaux sur les métastases cérébrales. Les sections suivantes détaillent les modèles développés à partir de celui-ci, puis les méthodes utilisées pour évaluer l'efficacité de Mad1*DNKR à freiner le développement des tumeurs.

2.5.1 Modèle syngénique de cellules bioluminescentes 4T1-br-luc sur souris Balb/c

2.5.1.1 *Modèle métastatique et sous-cutané*

La première version de l'expérience d'efficacité (Figure 20 haut) utilisait le modèle de cancer étudié par Dina Sikpa, avec une variation. Normalement, des 100 000 cellules 4T1-br-luc dans 100 uL de PBS sont injectées dans le ventricule gauche de la souris pour être disséminés dans l'organisme et ainsi former des métastases, préférentiellement cérébrales grâce au flux carotidien et au trophisme de ces cellules (Burnett et al., 2015; Lockman et al., 2010; Palmieri et al., 2007).

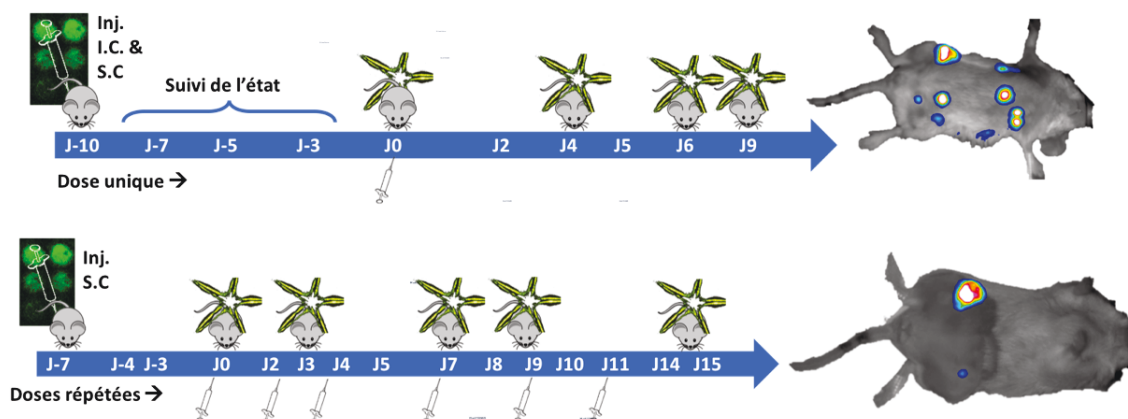


Figure 20. Séquences expérimentales des expériences d'efficacité.

Les jours clés sont indiqués sur la ligne du temps bleue. Les seringues représentent les doses de Mad1*DNKR, les étoiles représentent les séances d'imagerie. En haut, l'expérience avec le modèle métastatique. En bas, celle avec le modèle sous-cutané.

Une influence de Mad1*DNKR sur le développement de métastases cérébrales révélerait que notre traitement atteint ce site peu accessible. Puisque cette méthode était fastidieuse, nous implantons aussi des tumeurs sous-cutanées (5 000 cellules dans 20 μ L de PBS) vis-à-vis le coussin mammaire pour mimer un site orthotopique (section 2.5.1.3). Cette expérience visait à savoir si une seule dose élevée de Mad1*DNKR a un effet sur la croissance des tumeurs inoculées. Lorsque les cellules cultivées étaient préparées, les souris étaient identifiées, pesées, anesthésiées, puis épilées. La séquence expérimentale commençait une fois les cellules 4T1-br-Luc inoculées (Figure 20 haut). L'état des souris était périodiquement surveillé en cas d'apparition de point limite. La charge tumorale était mesurée 10 jours après l'inoculation des tumeurs, au jour 0 du traitement. Après l'acquisitions d'images, les souris recevaient la dose maximale tolérée de Mad1*DNKR puis étaient surveillées le reste de la journée. Les souris étaient épilées avant chaque séance. À la fin de l'expérience, ou à l'atteinte d'un point limite des animaux, nous les euthanasions en perfusant leur système sanguin, sous anesthésie, avec du paraformaldéhyde pour fixer les organes en vue d'analyses histologiques. L'analyse des images et des données sont décrites aux sections 2.5.3 et 2.5.4 respectivement.

2.5.1.2 Modèle sous-cutané

Après l'expérience avec le modèle métastatique, nous avons utilisé un modèle avec uniquement des tumeurs sous-cutanées (voir section 2.5.1.1). Nos objectifs étaient :

- Éviter la souffrance et la mortalité de nos animaux et d'obtenir des charges tumorales moins variables et plus reproductibles.
- Évaluer l'efficacité d'un traitement en doses répétées de Mad1*DNKR

La séquence expérimentale (Figure 20 bas) débutait à l'inoculation des tumeurs sous-cutanées. À partir du suivi prétraitement au jour 0, les souris recevaient trois doses de Mad1*DNKR par semaine. Les suivis en imagerie étaient deux fois par semaine puis à la fin des traitements. Les animaux étaient euthanasiés à la fin des suivis ou à la rencontre de points limites avec la méthode élaborée ci-haut. Certains animaux contrôles étaient réutilisés pour l'expérience de biodistribution.

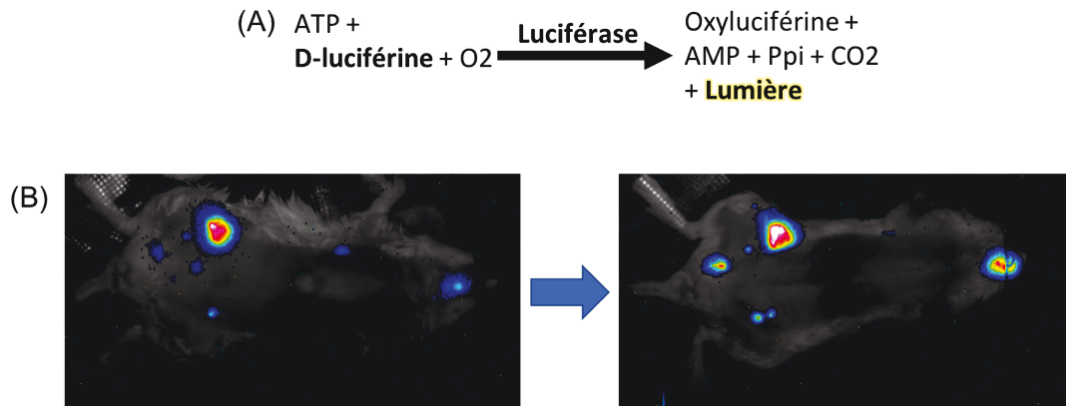


Figure 21. Tumeurs de cellules 4T1-br-luc bioluminescentes.

A) Réaction photochimique de la D-luciférine catalysée par la luciférase. B) Images superposées d'une souris Balb/c avec tumeurs à deux suivis différents. Les tumeurs augmentent en taille, donc en intensité lumineuse.

2.5.1.3 Cellules 4T1-br bioluminescentes

La lignée cellulaire 4T1 provient d'un carcinome mammaire de souris Balb/c (Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2000). Au niveau moléculaire, ces cellules présentent entre autres un

dérèglement de voies signalétiques entraînant la surexpression et l'activation de c-Myc (Ling & Arlinghaus, 2005; Ma et al., 2010; Tao et al., 2008). La lignée 4T1-br-luc est une variante formant préférentiellement des métastases cérébrales, dans laquelle est cloné le gène de la luciférase de luciole (Lerondel & Le Pape, 2013). Cette enzyme catalyse une réaction chimique avec la luciférine qui dégage de la lumière (Figure 21 A). Détectée par une caméra spécialisée (section 2.5.2), cette bioluminescence permet de suivre la croissance des tumeurs et d'évaluer la charge tumorale des souris (Figure 21 B) (Balathasan et al., 2013; Lee & Min, 2010; Tao et al., 2008).

Le modèle comporte un système immunitaire compétent. En effet, la lignée 4T1 provient de la variété de souris Balb/c utilisée pour l'expérience, empêchant le rejet de la greffe (Bemmo et al., 2010; Burnett et al., 2015). Cela simule la composante immunitaire rencontrée en clinique, mais implique potentiellement une immunisation à notre composé qui pourrait nuire à l'expérience par une baisse d'efficacité ou une réaction d'hypersensibilité.

Les cellules 4T1-br-luc sont cultivées dans un milieu de culture complet avec antibiotiques et passées aux 3 jours. Pour l'inoculation des tumeurs, elles sont récoltées à 80% de confluence pour maintenir la croissance une fois injectées. Elles sont ensuite comptées et diluées dans le PBS aux concentrations de 1×10^6 cellules/mL pour l'injection intracardiaque et $2,5 \times 10^5$ cellules/mL pour l'injection sous-cutanée.

2.5.2 Imagerie de bioluminescence

2.5.2.1 Matériel

L'équipement pour générer les images de tumeurs bioluminescentes consiste en un appareil conçu par l'équipe de techniciens et d'ingénieurs du Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke (CIMS) nommé OPTIMUS. Il s'agit d'une caméra digitale à haute précision dans un caisson opaque avec une paillasse téléguidée, équipée de buses pour anesthésier les animaux. À côté, un ordinateur contrôle la caméra à l'aide d'un logiciel programmé pour manœuvrer tout l'équipement. Lors de nos expériences d'efficacité avec le modèle sous-

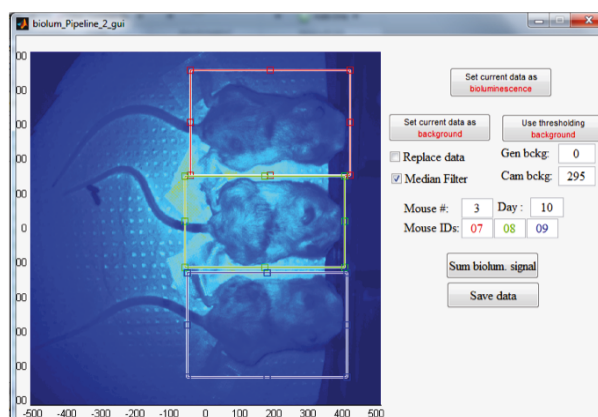
cutané, la nouvelle caméra Hnü 1024 (Nüvü caméras) était brisée et le logiciel correspondant était encore en développement.

2.5.2.2 Procédure d'acquisition des images de bioluminescence

D'abord, nous pesions les souris et inscrivions leurs poids dans une grille Excel, avec une note sur leur état. La grille était programmée pour calculer les dilutions de luciférine à préparer pour les injections à partir d'une solution concentrée en tenant compte d'une marge pour le volume mort de la seringue. Toutes les souris recevaient, par injection sous-cutanée, une dose de luciférine de 75 mg/kg dans 100 µL de PBS afin d'éviter l'incertitude des seringues. L'injection sous-cutanée est avantageuse. Sa cinétique de distribution procure un signal plus constant qu'une injection intra-péritonéale ou intraveineuse (Khalil & Jameson, 2013). De plus, elle se fait plus rapidement et nécessite moins de bouger l'animal.

Une fois les seringues de luciférine préparées, trois souris étaient anesthésiées, positionnées sur la paillasse de l'OPTIMUS avec un tapis chauffant, puis épilées au besoin. L'épilation se fait avec de la crème dépilatoire pour humains, très irritante pour une souris. Après l'avoir appliquée, il faut l'essuyer délicatement et rincer abondamment pour éviter de brûler la peau. Après avoir ajusté la caméra et le logiciel de contrôle, une image du signal était capturée de fond. L'image et le zoom sont centrés sur les trois souris, l'ouverture de la caméra est ajustée au maximum. Le focus était ajusté pour voir les souris le plus clairement possible. Le temps d'acquisition des images était de 5 minutes pour l'ancienne caméra et de 1 minute pour la Nüvü. Après l'injection sous-cutanée de luciférine, nous capturons une série d'images, jusqu'à ce que le signal de bioluminescence diminue, après quoi nous capturons une image avec lumière blanche pour identifier les souris. Ces images étaient renommées avec un titre codifié pour faciliter leur analyse.

A



A

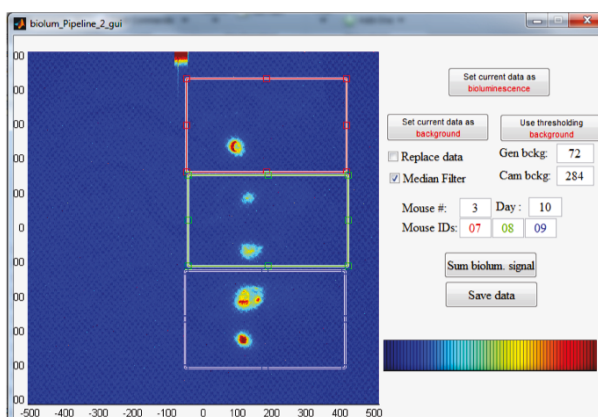


Figure 22. Interface du programme d'analyse d'images de bioluminescence.

Les rectangles de couleurs tracent les régions d'intérêt des souris selon l'identité attribuée aux souris. Gen Bckg : valeur de bruit de l'image correspondant au triple de la médiane des intensités des pixels après soustraction de la valeur la plus faible de l'image. Cam bckg : valeur la plus faible parmi les pixels de l'image. Mouse # : nombre de souris sur l'image. Mouse IDs : étiquette de chaque souris. Sum. Biolum. signal : calcul de la densité de signal dans les régions d'intérêt. Save Data : sauvegarde des données dans un tableau. A) Sélection des régions d'intérêt à partir de l'image blanche. B) Image de bioluminescence avant la soustraction du signal de fond.

2.5.3 Analyse des images de bioluminescence

Réjean Lebel a programmé avec Matlab le logiciel d'analyse d'images, nommé pipeline. On visualise sur l'interface les images analysées, les régions d'intérêt, les étiquettes de chaque souris, ainsi que les boutons des fonctions. Une partie du pipeline cueille les étiquettes des données sortantes à même le nom des fichiers d'images et des dossiers parents. Les valeurs sortantes sont classées sur Matlab dans un tableau transférable sur un autre logiciel. Différents outils du pipeline sont décrits ici-bas. (Figure 22)

2.5.3.1 Régions d'intérêt :

La charge tumorale de chaque souris est calculée à partir d'une région d'intérêt rectangulaire couvrant la face ventrale de la souris. Dans cette région, nous calculons la densité du signal, soit la somme des intensités de chaque pixel dépassant le signal de fond. Cette valeur représente la bioluminescence émanant de la souris pendant le temps d'acquisition et traduit la charge tumorale. Pour chaque cycle d'acquisitions, la valeur la plus élevée, correspondant au plateau de la bioluminescence, est sélectionnée. (Figure 22)

2.5.3.2 Filtre médian

Nous utilisons un filtre médian de dimension 3x3 pour supprimer le bruit de type « poivre et sel » attribuable à la caméra et non à l'environnement. Cette technique de filtration digitale nivèle chaque pixel à la valeur médiane de l'ensemble des 9 pixels dont il est le centre.

2.5.3.3 Correction du bruit de fond

Pour la première série d'expérience, les souris dans l'image de bruit de fond n'étaient pas exactement positionnées comme dans les images bioluminescentes. Réjean Lebel a donc traduit en code une transformation de l'image blanche en image de bruit de fond. En assumant que la capacité de refléter la lumière est constante pour chaque objet et que la source lumineuse est uniforme comme le bruit de fond dans l'obscurité, il est possible de

transformer l'image blanche en analogue proportionnellement obscur au bruit de fond après l'injection. Une fois la soustraction faite, les valeurs négatives sont ramenées à 0. Pour remédier à l'inexactitude potentielle d'une méthode nécessitant une image différente, une deuxième méthode de correction du bruit de fond a été développée (Figure 23). Elle consiste à supprimer de l'image une valeur de bruit de fond estimée à partir de la distribution de ses pixels. Les régions bioluminescentes étant minoritaires comparativement aux régions sombres, la majorité des pixels correspondent au bruit de fond. Avant tout, nous soustrayions de toute l'image l'intensité la plus faible qui s'y trouve. Ensuite, le pipeline calcule la médiane de la distribution, la multiplie par trois, puis la soustrait de l'image. Les valeurs négatives sont ramenées à 0. Nous avons choisi la médiane car ce paramètre statistique représente la valeur de bruit de fond la plus représentée dans l'image et n'est pas affecté, comme la moyenne, par les valeurs plus élevées du signal bioluminescent. Nous avons observé que la majorité du signal de fond était inférieur au triple de la médiane, d'où cet ajustement arbitraire. Il était possible de modifier cette valeur dans la case du pipeline Gen bckg.

En troisième lieu, il est possible de prendre en compte le signal de fond en utilisant une image prise avant l'injection de la luciférine lorsque l'animal est déplacé le moins possible. Cette image doit représenter parfaitement le signal de l'environnement externe et interne de la caméra en absence de toute source lumineuse, qu'il s'agisse des tumeurs bioluminescentes ou de la lumière du système OPTIMUS. Sa soustraction aux images bioluminescentes ne devrait laisser que le signal associé aux tumeurs bioluminescentes. Pour que cette méthode soit appropriée, le signal de fond de l'image obscure doit correspondre à celui des images bioluminescentes, c'est-à-dire qu'il doit être superposable géométriquement et équivalent en termes d'intensité. Cela n'était pas toujours possible car le contrôle de la caméra par le logiciel était déficient et la première acquisition présentait parfois une contamination lumineuse de source indéterminée.

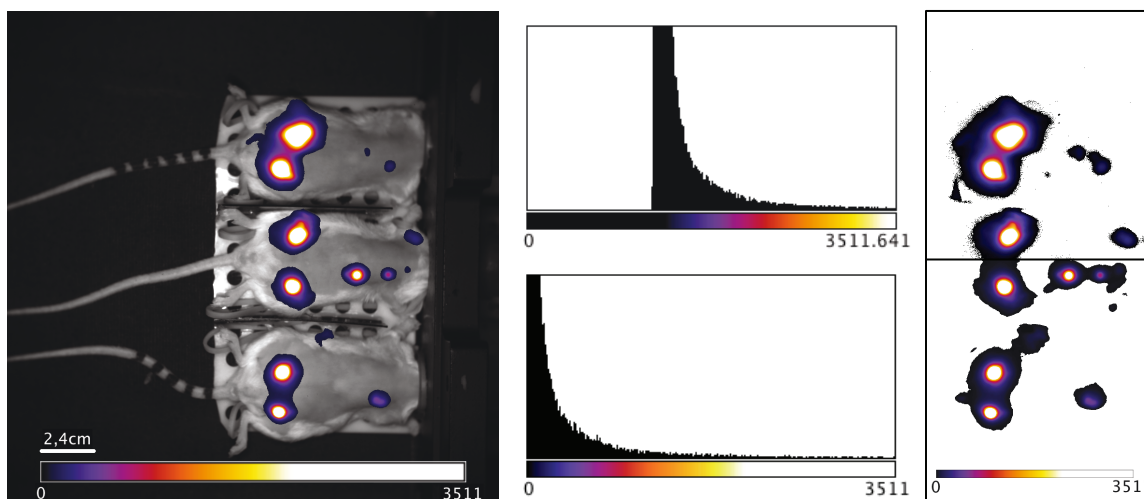


Figure 23. Méthode de correction du bruit de fond calculé.

À gauche, Disposition des souris Superposition du signal lumineux à l'image blanche. Milieu haut, histogramme de distribution des pixels de l'image. (En x, les valeurs d'intensité possibles ; en y, le nombre de pixels). Milieu bas, distribution des pixels après soustraction de la valeur minimale et de la médiane divisée par trois. Droite, image de la bioluminescence après soustraction du bruit de fond calculé, juxtaposée avec le filtre médian (bas).

2.5.4 Analyse des données

Le but de l'analyse de données était de déceler une différence entre les charges tumorales des souris du groupe contrôle par rapport à celles du groupe traité avec Mad1*DNKR. Pour ce faire, les charges tumorales avant le début du traitement étaient normalisées avec celles avant le début du traitement. Autrement dit, la valeur de bioluminescence totale d'une souris à un suivi particulier était divisée par la valeur avant l'initiation du traitement, afin d'en faire ressortir une croissance relative. La valeur résultante est la charge tumorale relative pour chaque souris à un moment particulier. Pour chaque jour de suivi, les charges tumorales des groupes traités et contrôle sont comparées avec une analyse statistique de type t-test. Ce type d'analyse assume une distribution normale de nos données.

3. Résultats

3.1 Méthodes de détection

3.1.1 ELISA

Le Tableau 2 présente les concentrations d'anticorps trouvées pour la détection optimale de Mad1*DNKR. La concentration minimale qui produit un signal substantiel est de 5 µg/mL. Le signal généré dépasse le double du signal du bruit de fond, seuil de référence pour la limite inférieure. Le Tableau 4.1.1-2 présente les valeurs de densité optiques (DO) obtenues avec les deux combinaisons d'anticorps pour la courbe étalon de Mad1*DNKR utilisée dans l'expérience de titrage. Bien que la DO varie légèrement d'une concentration à l'autre, aucun signal ne s'éloigne autant du bruit de fond (0 µg/mL) que 5 µg/mL. Cette sensibilité semblait insuffisante pour nos expériences subséquentes. De plus, lors de l'ajout de plasma avec inhibiteurs de protéases, la valeur de signal de fond augmente substantiellement, montrant qu'une plus grande spécificité est nécessaire.

Tableau 2. Combinaisons d'anticorps résultant à un ratio signal-bruit >2 pour 5 µg/mL de Mad1*DNKR

Titration	Anti-Mad1* monoclonal (Sigma-Aldrich SAB1402257)	Anti-Mad1*DV Polyclonal (Immune Biosolutions, Y00036-002)	Alpaca Anti- chicken IgG (Immune Biosolutions Y00008-002)	Ratio signal- bruit moyen pour 5 µg/mL
Combinaison 1	1 :15000	1 :2500	1 :20000	3,1
Combinaison 2	1 :10000	1 :2500	1 :20000	2,6

Tableau 3. Valeurs moyennes de densité optique (n = 2) des concentrations d'anticorps titrées résultant en un ratio signal-bruit >2 pour différentes concentrations de Mad1*DNKR

Matrice	Mad1*DNKR (µg/ml)	Combinaison 1	Combinaison 2
PBS	5	0,3302	0,2764
	1	0,1217	0,1229
	0,5	0,1199	0,1289
	0,1	0,1116	0,1081
	0,05	0,1065	0,1102
	0	0,1059	0,1076
Plasma dilué dans le PBS 1 :10	0,5	0,1355	0,1515
	0	0,1186	0,1144

3.1.2 Immunobuvardage de type Western

Malgré les nombreux essais d'optimisation, aucune modification des paramètres de la méthode d'immunobuvardage de type Western n'a apporté une amélioration significative au signal détecté. Le Tableau 4 ci-dessous représente les ingrédients typiques des Immunobuvardages effectués.

<u>Tableau 4. Liste du matériel utilisé pour l'immunobuvardage</u>	
Membrane	Nitrocellulose
Tampon de rinçage	Tris-Buffered Saline + Tween-20 0,1%
Solution de blocage	TBST + Lait en poudre écrémé Carnation (lait) 10% (m/v)
Anticorps primaire	TBST + Lait 1% + Anti-Mad-DV 1:5000
Anticorps secondaire	TBST + lait 1% + Alpaca anti-chicken-IgY 1 :15000
Réactif de révélation	SignalFire™ ECL (Cell Signaling Technology)
Appareil	Caméra CCD Fusion Pulse Solo-S (Analisis)

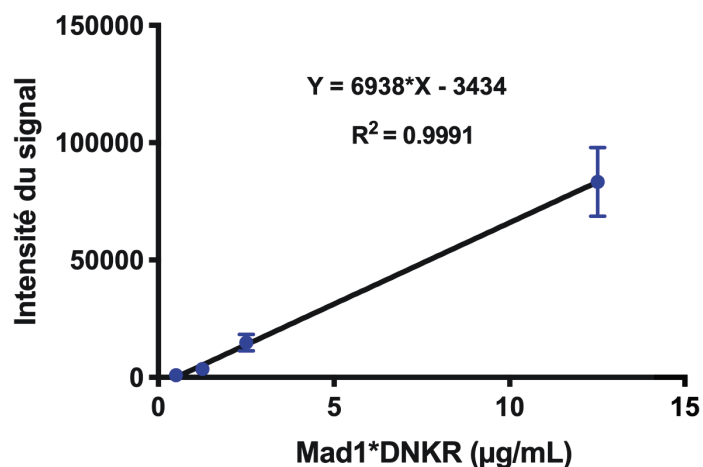


Figure 24. Courbe Standard de Mad1*DNKR en immunobuvardage de type Western.

La concentration de protéine mise en relation avec l'intensité du signal lumineux émis par la réaction enzymatique.

La Figure 24 ci-dessus est une courbe standard de Mad1*DNKR produite selon la méthode décrite. Les points résultent de la combinaison de trois immunobuvardages distinct réalisés le même jour avec les mêmes concentrations. Une linéarité du signal est détectée pour les concentrations allant de 0,5 à 12,5 ug/mL. Une courbe standard linéaire est utile pour mesurer la quantité de Mad1*DNKR d'un échantillon inconnu sur un même gel SDS-PAGE. Il ne s'agit pas toutefois de triplicatas puisqu'elles ne proviennent pas de la même membrane. La courbe standard des valeurs compilées de 7 expériences effectuées à des dates différentes, avec des concentrations différentes, est présentée à la Figure 25. Sa pente (7254 ± 512 DO) et son ordonnée à l'origine (-2943 ± 2930 DO) sont équivalentes à celles de la Figure 24 (pente : 6938 ± 150 DO et ordonnée à l'origine : -3434 ± 959 DO).

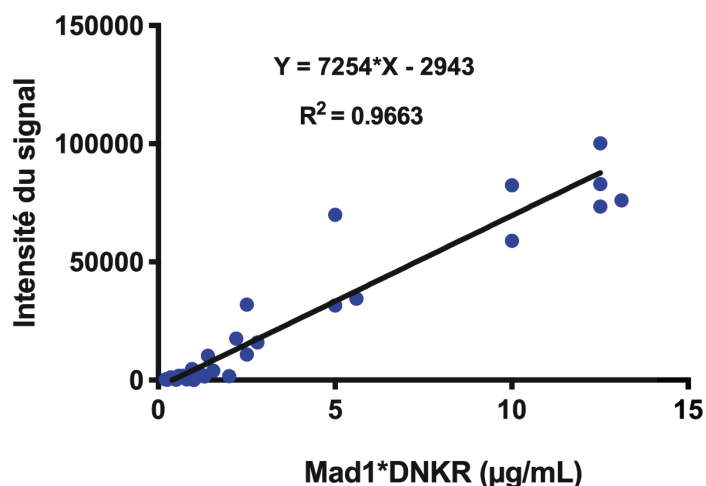


Figure 25. Compilation des valeurs d'intensité de Mad1*DNKR de sept immunobuvardages de type Western calibrés avec ImageJ.

3.2 Détermination de la dose maximale tolérée

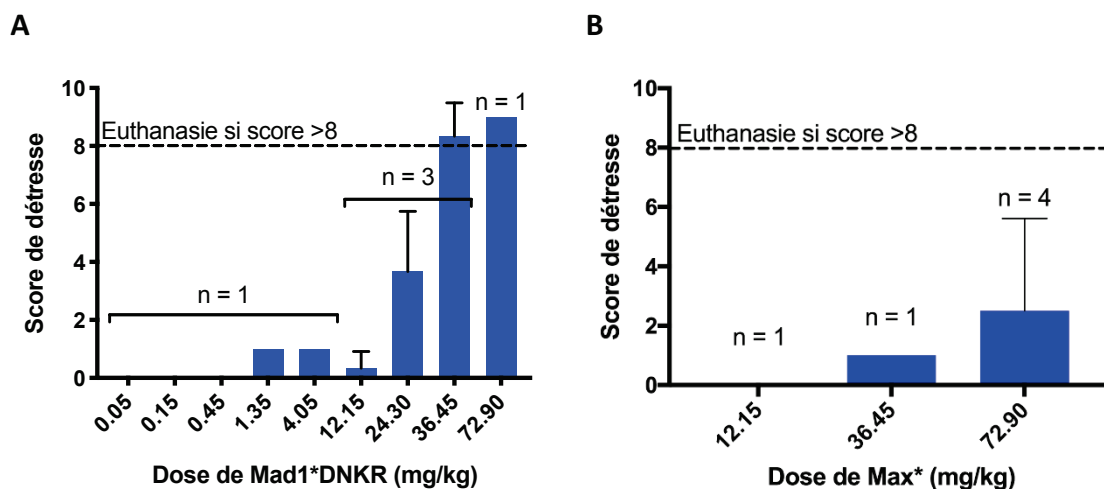


Figure 26. Détermination de la dose maximale tolérée de A) Mad1*DNKR et B) Max*.

La Figure 26 représente les résultats des essais de toxicité en dose aiguë effectués avec Mad1*DNKR (panneau A) et Max* (panneau B). L'augmentation des doses avec Max* n'a causé aucun signe de détresse nécessitant l'euthanasie. Pour des raisons pratiques, notamment la production de cette protéine, la dose maximale a été fixée à 72,9 mg/kg. Pour Mad1*DNKR, la dose maximale tolérée a été fixée à 24,3 mg/kg. À cette dose, certains

signes de détresse étaient apparents, mais disparaissaient après quelques heures. La dose de 36,45 mg/kg entraînait un score de 8.

Lors des administrations en doses répétées de Mad1*DNKR (24,3 mg/kg 3 fois par semaine pour deux semaines), nous n'avons pas observé de signes de détresse. Toutefois, durant l'expérience d'efficacité (section 2.5.1.2) avec le même traitement, nous avons remarqué des effets toxiques notables causant la mort chez la moitié des animaux traités après la quatrième et la cinquième dose. Ces effets n'avaient pas été remarqués dans l'expérience de détermination de la dose maximale tolérée avec administrations répétées. Il est à noter que les animaux étaient porteurs de tumeurs dans l'expérience d'efficacité.

3.3 Expériences de demi-vie

3.3.1 Demi-vie plasmatique ex vivo

3.3.1.1 Max*

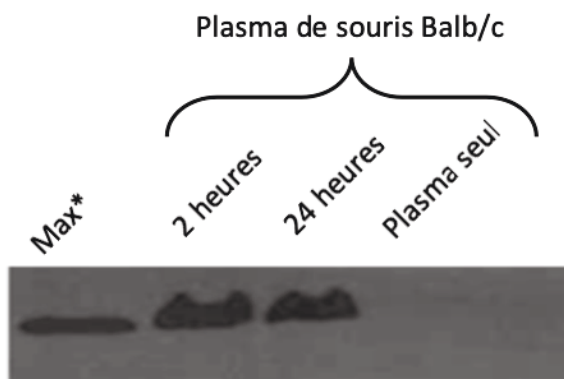


Figure 27. Stabilité ex-vivo de Max* en fonction du temps dans le plasma de souris Balb/c.

Immunobuvardage de type Western avec Max* incubé à différents temps dans le plasma de souris : De gauche à droite : Contrôle positif ; incubation de 2h, incubation de 24h, contrôle négatif avec plasma seul.

Max*, la version tronquée du b-HLH-LZ de Max, est stable au moins 24 heures dans le plasma de souris commercial (Figure 27). Il n'est pas dégradé par les enzymes plasmatiques durant ce délai.

3.3.1.2 *Mad1*DNKR*

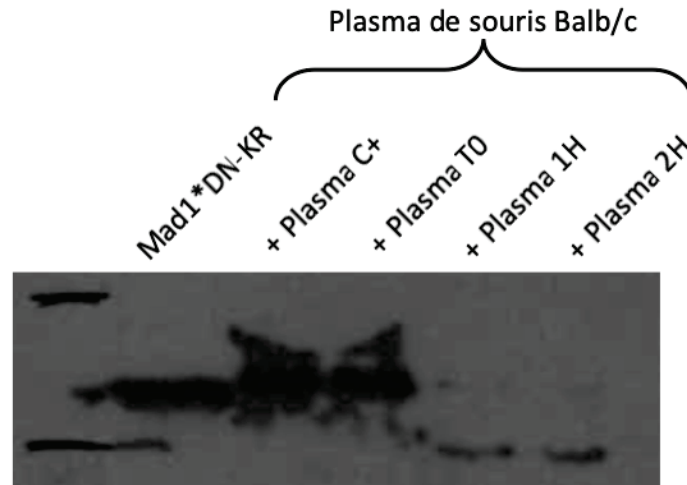


Figure 28. Stabilité ex-vivo de Mad1*DNKR.

Immunobuvardage de type Western avec Mad1*DNKR* incubé à différents temps dans le plasma de souris : de gauche à droite : Mad1*DNKR seul ; contrôle positif de Mad1*DNKR avec plasma ; incubation avec plasma à 0 minutes ; incubation à 1h ; incubation à 2h.

Cet exemple d'immunobuvardage de type Western montre Mad1*DNKR presque entièrement dégradé par les enzymes plasmatiques après une heure. Sur d'autres immunobuvardages non présentés ici, nous observons une dégradation complète en 15 minutes.

3.3.2 Site de clivage

Nous avons fait analyser par spectrométrie de masse le contenu dans la bande visible du gel SDS-PAGE ayant migré plus loin que Mad1*DNKR sur l'échelle de poids moléculaire (Figure 17). Le résultat de l'analyse montre que cette protéine est une version tronquée de la protéine au niveau du domaine basique (Figure 29). Le site de clivage identifié comprend

des acides aminés basiques (KNRR) retrouvés fréquemment dans les sites clivés par les enzymes plasmatiques (Böttger et. al., 2017; Jambunathan & Galande, 2014). Les clivages subséquents forment des peptides dont le poids moléculaire est trop faible pour être détecté en SDS-PAGE.

MSRSTHNEME KNRRAHLRLS LKKLKRLVPL GPRESSRHTTL SLLTKAKLHI KKLEDSNRKA
IHQIDQLQRE QRHLKRQLEK LGGSGC

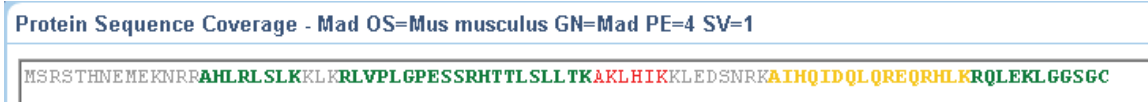


Figure 29. Séquence d'acides aminés de Mad1*DNKR et de son fragment clivé *ex vivo*, élucidé par Phenoswitch Biosciences.








En haut : structure primaire de Mad1*DNKR; la portion en rouge est clivée par les enzymes protéolytiques du plasma de souris. En bas : Rapport de la couverture de la séquence de Mad1*DNKR selon les fragments identifiés par l'analyse de la spectrométrie de masse. La couverture de la séquence au-delà des acides aminés KNRR du domaine basique indique que la protéine est clivée à ce site. Légende du rapport : « En vert = bon peptide ; En jaune = peptide probablement identifié ; En rouge = faible probabilité d'avoir identifié ce peptide »

3.4 Métabolisme In vivo

3.4.1 Choix de l'anticoagulant

L'EDTA concentré à 10 mM a été testé comme anticoagulant dans une expérience de digestion plasmatique *ex vivo*. Un signal similaire au Mad1*DNKR sans plasma est détecté après 1h d'incubation avec le plasma + EDTA 10 mM.

3.4.2 Demi-vie biologique

Tableau 5. Demi-vie pharmacocinétique de Mad1*DNKR par immunobuvardage de type Western		
Date (mois-année) – étiquette de la souris	Buvardages des prélèvements (minutes)	Demie-vie calculée (minutes)
05-2017 SC2-11	Plas ¼ 2 5 10 15 20 40 C+ C+ 	13,2
05-2017 SC2-15	Plas 2 5 10 15 20 40 60 C+ C+ 	6,9
04-2017 B069	2 5 10 20 40 60 Plas C+ C+ 	4,7
03-2017 B048	Plas 2 5 10 20 40 60 C+ C+ C+ 	2,5
16-06-2017 PK01	Plas ½ 2 5 10 15 20 30 C+ C+ 	1,0
16-06-2017 PK02	Plas 5 10 15 20 30 40 60 C+ C+ 	3,1
03-2017 B044	C+ C+ 2 5 10 20 40 60 Plas 	21,99
Légende. Plas : Plasma pré-injection (contrôle négatif) ; C+ : contrôle positif (Mad1*DNKR seul)		

Le Tableau 5 montre les immunobuvardages de type Western générés lors des expériences de métabolisme *in vivo* suivant l'injection de 24,3 mg/kg de Mad1*DNKR. La moyenne des valeurs de demi-vie est de 5,9 minutes avec un écart type de 4,4 minutes. Il est à préciser que cette demi-vie représente le taux de disparition de Mad1*DNKR du compartiment sanguin de la souris. Mad1*DNKR est détectable dans le plasma de souris 20 à 60 minutes après l'administration de la dose maximale tolérée (24,3 mg/kg). Le produit de dégradation est visible dans quelques échantillons. Les conditions pour reproduire ce phénomène sont

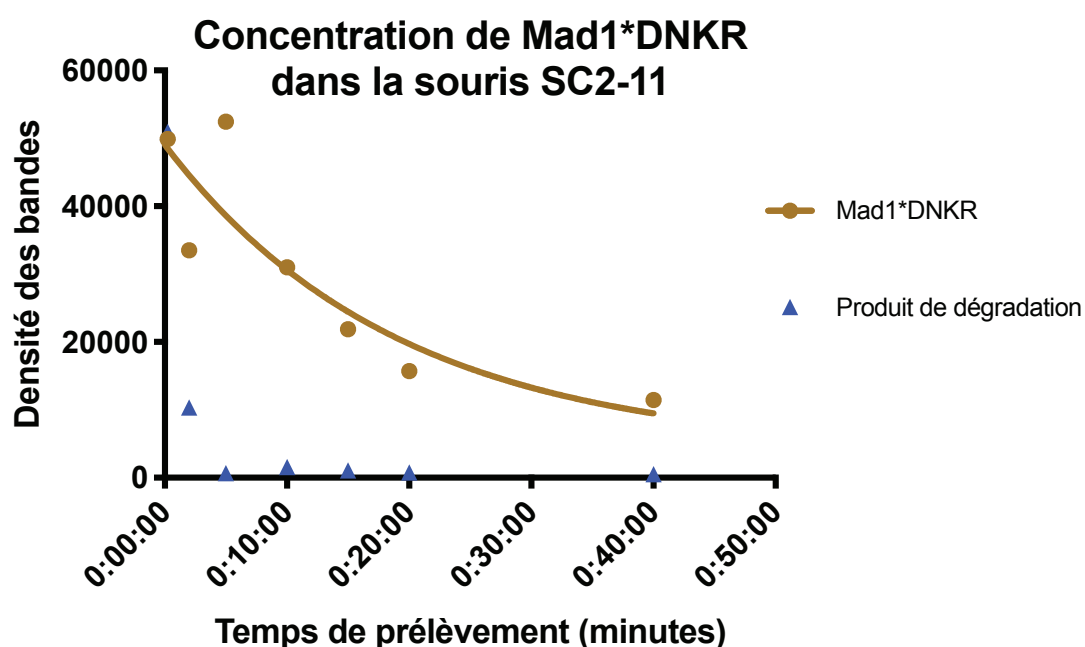


Figure 30. Évaluation de la demi-vie plasmatique de Mad1*DNKR dans l'animal avec la décomposition mono-exponentielle du signal à différents temps.

La Figure 30 illustre le graphique d'une courbe de dégradation monoexponentielle, soit le modèle utilisé pour faire ressortir les valeurs de demi-vie du Tableau 5.

3.4.3 Biodistribution

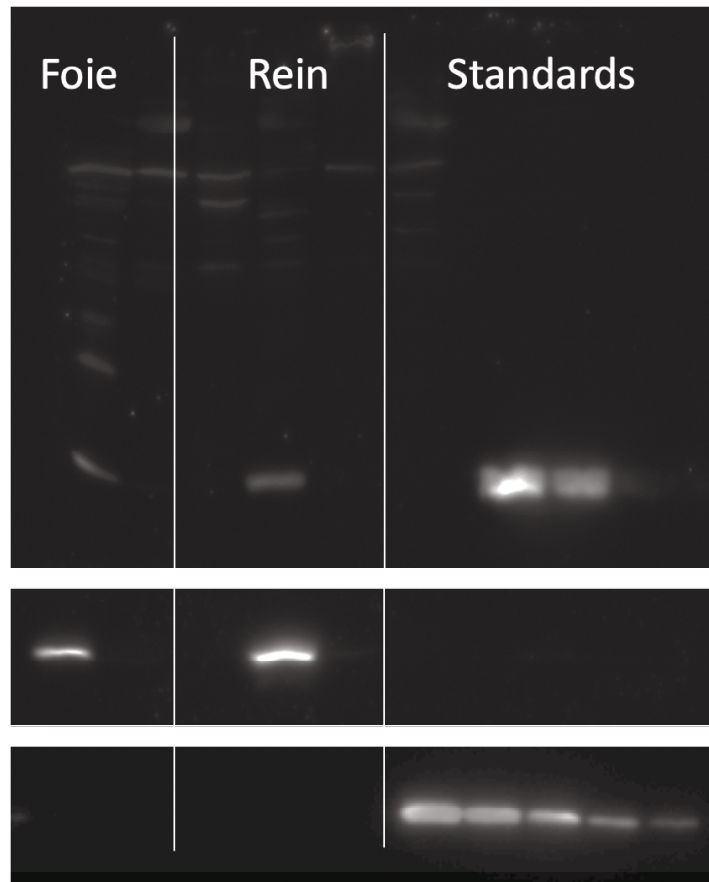


Figure 31. Immunobuvardages d'organes sélectionnés et de standards de Mad1*DNKR.

En haut : Sur une membrane entière, on peut voir des bandes de signal non spécifique ailleurs qu'au niveau des standards de Mad1*DNKR. Au milieu : Les échantillons sont visibles et les standards invisibles dans cette itération de l'expérience. En bas : Nous avons rencontré la situation inverse dans une autre itération de l'expérience.

Les expériences de biodistribution suggèrent la présence de Mad1*DNKR intact dans le foie et dans les reins des souris exactement une heure après l'administration de la dose maximale tolérée (24,3 mg/kg). Un faible signal est détectable dans les poumons (Résultat non publié). Tel que mentionné à la section 2.1.2, l'élaboration de l'expérience a comporté de plusieurs variations pour juxtaposer une courbe standard aux échantillons sur les gels de SDS-PAGE. Le but était d'établir une relation linéaire entre les concentrations de standard et le signal. Ce résultat fut difficilement obtenu (Figure 31 A), avec insuffisamment

de standard pour inférer des valeurs. Les immunobuvardages où les échantillons d'organes étaient bien visibles (Figure 31 B) avec au moins une concentration de standard, permettent au moins d'y conclure leur présence.

3.5 Efficacité sur modèle de cancer *in vivo*

3.5.1 Modèle Métastatique

L'expérience d'efficacité avec le modèle métastatique génère un résultat non-significatif. Tel qu'on peut le voir sur la Figure 32, les barres d'erreur des données des groupes traités

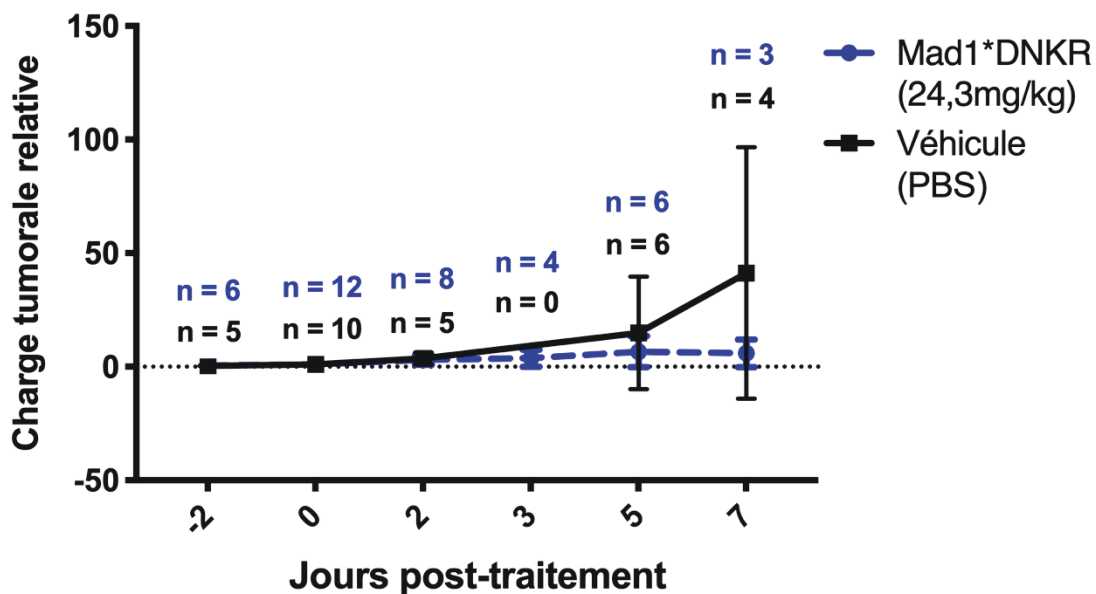


Figure 32. Effet d'une dose unique de Mad1*DNKR (bolus IV dans la veine caudale) sur la charge tumorale des souris avec tumeurs sous-cutanées et métastases de cellules 4T1.

et non-traités se recoupent largement. Selon le t-test, il n'y a pas de différence de la charge tumorale entre les groupes aux temps mesurés ($p > 0,3$ pour les jours post-traitement). De plus, le nombre d'animaux dans chaque groupe diminue à partir du jour 3, au point d'avoir au plus 3 animaux par point, ce qui contribue à la faible puissance statistique du modèle.

3.5.2 Modèle sous-cutané

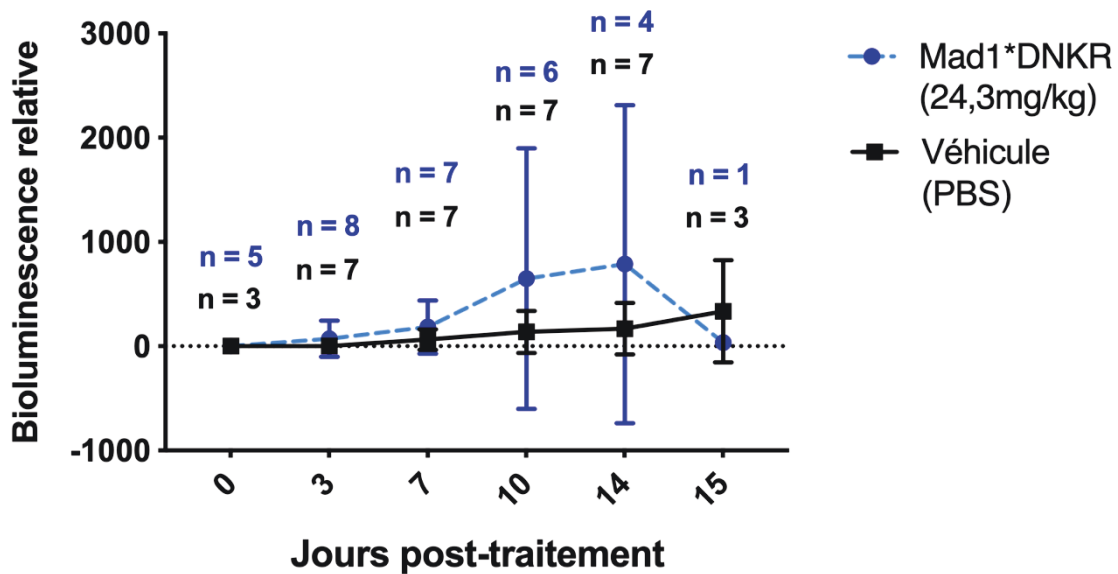


Figure 33. Effet de 6 doses Mad1*DNKR, à raison de 3 par semaine, sur la charge tumorale des souris avec tumeurs sous-cutanées de cellules 4T1

L'expérience d'efficacité avec le modèle de tumeurs sous-cutanées génère un résultat non-significatif. Tel qu'on peut le voir sur la Figure 33, les barres d'erreur des données des groupes traités et non-traités se recoupent largement. Selon le t-test, il n'y a pas de différence de la charge tumorale entre les groupes aux temps mesurés ($p > 0,25$ pour les jours post-traitement). De plus, le nombre d'animaux dans chaque groupe diminue à partir du jour 7 de la séquence, au point d'avoir au plus 3 animaux par point, ce qui contribue à la faible puissance statistique du modèle.

4. Discussion

Les résultats ci-haut représentent, entre autres, les premières expériences de validation préclinique *in vivo* avec les B-HLH-LZ développés dans le laboratoire de Pierre Lavigne. Il en ressort une information cruciale pour la poursuite du projet : la séquence du fragment clivé dans le plasma de souris. En effet, cette information détaille le résultat de l'expérience de stabilité *ex vivo*, et éclaire la solution au problème de la courte demi-vie de Mad1*DNKR. L'accumulation d'un B-HLH-LZ au niveau de sa cible, le noyau des cellules cancéreuses, dépend du temps. (Montagne et al., 2012) Plus la protéine se dégradera lentement, plus elle pourra se distribuer dans l'organisme, traverser les barrières physiologiques et les membranes biologiques, s'accumuler dans les tumeurs, pénétrer dans les cellules et sortir des endosomes pour atteindre le noyau. Il s'agit donc d'une limite à l'exécution d'un essai d'efficacité en modèle *in vivo*, et à l'évaluation de la biodistribution (Section 4.4.2). En sachant la position du site de clivage de Mad1*DNKR, il est maintenant possible de modifier sa séquence afin d'augmenter sa stabilité et assurer l'efficacité théorique dans les expériences *in vivo*, à condition d'utiliser un modèle caractérisé (Section 4.5.5).

Mad1*DNKR possède le plus grand potentiel cytotoxique dans les cellules A549 parmi les candidats développés, incluant Omomyc (Patent N° WO 2017/185171 A1, 2017). Ce dernier possède une demi-vie de $53,2 \pm 14,8$ h (Beaulieu et al., 2019), ce qui lui confère un avantage pharmacocinétique. D'ailleurs, les résultats préliminaires de pharmacocinétique avec Mad1*DNKR suggèrent que celui-ci est encore présent dans l'organisme après une heure. Il serait possible qu'il demeure dans l'organisme plus longtemps qu'anticipé. La demi-vie estimée est limitée par le modèle mathématique choisi pour l'analyse (Section 4.3.2.2).

D'autres molécules en développement visent à inhiber c-Myc directement en empêchant son interaction avec Max. Précédemment, leur potentiel thérapeutique était limité par des propriétés pharmacocinétiques désavantageuses (Fletcher & Prochownik, 2015). La poursuite des recherches sur la relation structure-efficacité des petites molécules inhibitrices de c-myc ont généré d'importants progrès au niveau de l'efficacité, de la biodistribution et de la stabilité (Allen-Petersen & Sears, 2019; Whitfield et al., 2017). Cela ne peut qu'inspirer à poursuivre le développement des analogues de Mad1*. Sur ce, une

fois que la stabilité du B-HLH-LZ candidat sera améliorée, il sera possible de poursuivre la validation de son potentiel thérapeutique avec les leçons tirées des expériences de cette maîtrise.

4.1 Méthodes de détection

4.1.1 ELISA

La méthode d'ELISA direct utilisée en premier n'est pas optimale. La quantité très faible de Mad1*DNKR aurait été en compétition avec les protéines des extraits d'organes pour l'adsorber au fond de la plaque. Pour détecter une protéine comme Mad1*DNKR dans un large éventail de concentrations, il est idéal d'avoir une étape de séparation, ce qu'apporte l'ELISA sandwich avec l'anticorps de capture.

Le développement de l'ELISA sandwich a été stoppé pour de nombreuses raisons. Premièrement, je n'ai pas réussi à produire une courbe standard dont le signal variait proportionnellement à la concentration de Mad1*DNKR avec un signal dépassant substantiellement le bruit de fond. Les concentrations évaluées avaient été sélectionnées en fonction de ce que nous nous attendions de trouver dans les organes. Pourtant, le signal généré par 0,1 µg/mL de Mad1*DNKR est trop près du bruit de fond généré par un contrôle négatif sans la protéine d'intérêt. Cette légère différence est complètement escamotée par l'ajout de plasma inactivé comme contaminant, ce dernier générant un signal de fond supplémentaire. Il faudrait évaluer cet impact sur le signal d'une courbe standard et du contrôle négatif pour tous les organes avec un homogénat contrôle.

L'affinité des anticorps avec Mad1*DNKR limite la sensibilité de l'essai. L'anticorps utilisé pour la détection, Anti-Mad-DV, est un anticorps polyclonal produit à partir d'un autre mutant de Mad. Sa spécificité et sa sensibilité peuvent être limitées. De plus, le produit de dégradation de Mad1*DNKR détecté dans certaines expériences serait indiscernable par l'ELISA puisqu'il n'y a pas de séparation pondérale comme en SDS-PAGE. Son interaction avec les anticorps et son influence sur le signal restent inconnues (Hnasko et. al., 2011).

Selon les résultats du développement d'un essai ELISA pour la détection Mad1*DNKR, les concentrations pour lesquelles une linéarité serait constatée entre 25 et 2,5 µg/mL. Il faudrait refaire cette expérience avec la plaque schématisée à la Figure 34.

Cette plaque comprendrait des concentrations de Mad1*DNKR jusqu'à 0,5 µg/mL afin d'examiner la variation de la relation entre la concentration d'analyte et le signal obtenu. Les quadruplicata permettraient des valeurs moyennes calculées plus fiables. Deux autres ensembles de standards seraient étudiés en présence de matrices différentes (homogénats, plasma, albumine) afin de comparer la courbe obtenue. Le PBS servirait de comparatif sans contaminant. L'albumine bovine sérique (BSA) servirait à étudier l'impact d'une concentration précise de protéines uniformes sur le signal de la courbe. Un extrait protéique de foie non-traité dilué à concentration connue avec inhibiteurs de protéases mimerait le contexte expérimental. Si la BSA simule la contamination protéique des homogénats, l'ELISA pourrait être utilisé sur les échantillons biologiques.

	Mad1*DNKR pur				Mad1*DNKR contaminé à la BSA				Mad1*DNKR contaminé à l'extrait de foie			
Mad1*DNKR : 20 ug/mL	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Mad1*DNKR : 15 ug/mL	B1	B2										
Mad1*DNKR : 10 ug/mL	C1											
Mad1*DNKR : 5 ug/mL	D1											
Mad1*DNKR : 2,5 ug/mL	E1											
Mad1*DNKR : 1 ug/mL	F1											
Mad1*DNKR : 0,5 ug/mL	G1											
Mad1*DNKR : 0 ug/mL	H1											

Figure 34. Disposition proposée des échantillons sur une plaque pour calibrer l'ELISA.

4.1.2 Immunobuvardage de type Western

L'immunobuvardage de type Western est la méthode de détection la plus accessible pour Mad1*DNKR. La séparation pondérale des protéines par électrophorèse a deux avantages. Le signal associé à Mad1*DNKR est plus spécifique qu'avec l'ELISA puisque les protéines de masse différente ne migrent pas au même niveau dans le gel. Par exemple, le fragment clivé de Mad1*DNKR génère une bande distincte de la protéine entière, alors que dans l'ELISA de type sandwich, le signal provient de toutes les protéines liées par l'anticorps de capture, spécifiquement ou non. La séparation du fragment clivé a permis l'analyse de sa séquence et de son métabolisme dans les expériences de métabolisme in vivo et ex vivo (sections 3.3 2 et 3.4).

Néanmoins, la méthode d'immunobuvardage n'est pas idéale pour la quantification. On y quantifie en comparant à l'échantillon un ou deux standards par produit croisé. Cette méthode ne tient pas compte de la relation mathématique entre la concentration de la protéine d'intérêt et le signal généré. La linéarité de cette relation est limitée sur une portion de l'écart dynamique, autour de laquelle la méthode est limitée. Les nombreux paramètres de l'expérience et les faibles volumes des échantillons ajoutent de nombreuses incertitudes. Malgré la variabilité de nos résultats, il demeurerait fiable de comparer les échantillons et les standards dans un même gel. Justement, dans les expériences de métabolisme, nous analysons la dégradation de Mad1*DNKR plutôt que sa concentration elle-même. Pour affiner la méthode, il serait envisageable de calibrer chaque photographie d'immunobuvardage pour combiner les courbes de différentes expériences. En effet, l'outil de calibration d'ImageJ permet de jumeler les concentrations des étalons avec les valeurs moyennes d'intensité des bandes associées. L'outil d'analyse de gels d'imageJ considère par la suite cette calibration et contourne ainsi la variabilité due aux nombreux paramètres en lien avec la photographie des immunobuvardages. La méthode de quantification idéale pour le projet de développement de b-HLH-LZ comme Mad1*DNKR est la spectrométrie de masse en tandem. Cette méthode peut identifier et quantifier des protéines faiblement concentrées et éviterait de calibrer à nouveau une méthode immunologique pour un analogue de Mad1*DNKR ou un fragment clivé (van den Broek et. al., 2013).

4.2 Détermination de la dose maximale tolérée

La dose maximale tolérée a été utilisée comme point de départ pour les expériences *in vivo* subséquentes avec Mad1*DNKR. Toutes les doses inférieures semblent donc sécuritaires lors d'une administration unique. Il serait pertinent d'évaluer si les effets secondaires nuisibles aux expériences sont dose-dépendants. L'administration répétée de la dose maximale tolérée, trois fois par semaine pendant deux semaines, sur trois souris CD-1 et trois Balb/c, suggérerait que la toxicité ne serait pas un obstacle à l'expérience d'efficacité. Toutefois, lors de cette expérience, où un plus grand nombre d'animaux recevaient le traitement, des effets toxiques mortels ont été remarqués chez la moitié des animaux. Dans les instants après l'injection de la quatrième ou de la cinquième dose, les animaux traités présentaient de l'œdème et de la rougeur, probablement dus à une vasodilatation, ainsi que des spasmes et de la dyspnée menant à la suffocation et la mort. L'hypothèse la plus plausible est un choc anaphylactique en réaction à Mad1*DNKR. Les traces d'endotoxines bactériennes provenant de la synthèse protéique, l'irritation au site d'injection, l'impact physiologique des tumeurs implantées, et l'immunogénicité potentielle de Mad1*DNKR sont tous des facteurs ayant pu favoriser une immunisation et une telle réaction d'hypersensibilité. (Castells, 2015; Khan, 2016). Les différents lots de Mad1*DNKR et la manutention non-stérile des doses sont des aspects qui pourraient être mieux surveillés. Aussi, dans une expérience plus poussée, nous aurions pu détecter la présence d'anticorps contre notre protéine dans le plasma de souris par un essai d'ELISA indirect. Cette méthode est couramment utilisée pour évaluer le profil immunogénique de médicaments biologiques en développement. La connaissance préalable de ce potentiel de réaction sévère et sa nature immunitaire aurait fortement influencé les expériences subséquentes. Notamment, les méthodes de purification et de manutention de la protéine seraient à ajuster, ainsi que notre choix de modèle pour les expériences d'efficacité, car un modèle immunodépourvu permettrait d'évaluer l'efficacité en contournant cet obstacle. D'abord, la purification de Mad1*DNKR devrait comprendre une étape uniforme d'extraction des endotoxines et une vérification de leur absence du lot de Mad1*DNKR.

Ensuite, la préparation des doses de Mad1*DNKR devrait être optimisée pour garantir la stérilité du produit. Par exemple, la solution mère devrait être diluée sous hotte stérile et réservée dans une fiole stérile à 4°C. Les doses devraient être prélevées de cette fiole au volume calculé pour chaque souris avec une seringue de précision. Les types de seringues les plus précis sont des seringues mécaniques réutilisables (p. ex. Socorex 187 avec support à flacon, capacité de 0,3 mL; modèle 187.1.F05003) ou des seringues à insuline 0,3 mL (p. ex. Covidien Monoject Softpack, faible volume mort) et la méthode d'injection serait à réajuster en conséquence.

L'objectif principal de l'expérience de toxicité est en fait la détermination d'une dose pouvant être administrée sans que les effets secondaires interfèrent avec les résultats pré-cliniques. Cette dose s'apparente à la dose sans effet nocif observable (*no observed adverse effect level* ou NOAEL), souvent utilisé en toxicologie ou en pharmacologie préclinique. Toutefois, notre dose maximale tolérée n'est pas sans effets nocifs (Tabrizi et al., 2009; Tabrizi & Roskos, 2007). L'animal est visiblement dérangé par l'administration de 24,3 mg/kg de Mad1*DNKR. Peu ou pas de symptômes de malaise n'étaient détectés à la dose inférieure, et les signes de souffrance observés à la dose supérieur dépassaient le point limite de l'expérience.

Beaucoup plus de paramètres de toxicité auraient pu être étudiés lors de ces expériences (Q. Zhang et al., 2015). L'étude du profil toxicologique des b-HLH-LZ subséquents optimiserait l'utilisation des animaux. Par exemple, le compte de leucocytes, en comparaison avec un groupe contrôle, témoignerait de l'impact des dérivés de b-HLH-LZ sur la prolifération de cellules à taux de renouvellement élevé; l'analyse biochimique de certains marqueurs sanguins reflèterait une potentielle toxicité hépatique; l'observation directe ou histologique des organes dévoilerait des effets secondaires plus ou moins reliés au mécanisme d'action. En raison de la courte demi-vie de Mad1*DNKR, ces paramètres devraient être évalués suite à l'administration de doses répétées afin de favoriser l'accumulation des effets.

Les paramètres mentionnés ci-haut devraient donc être évalués au travers des expériences subséquentes, puisqu'ils ne sont pas assez pertinents à ce stade-ci pour y sacrifier des

ressources supplémentaires. Ainsi, lors de l'évaluation des nouveaux composés, les effets secondaires pourraient être étudiés à même plusieurs groupes traités à différentes doses.

4.3 Métabolisme

4.3.1 Stabilité ex vivo

4.3.1.1 Max*

La demi-vie de Max* dans le plasma de souris Balb/c en fait un candidat intéressant. La protéine est retrouvée au même poids moléculaire sur l'immunobuvardage de type Western, donc probablement intègre, après 24h d'incubation. Ce résultat ne fait pas état des autres mécanismes de dégradation *in vivo*. Une fois injecté dans un organisme vivant, Max* sera probablement éliminé par le foie ou les reins, avec une demi-vie différente. Les études *in vitro* révèlent que Max* n'est pas aussi efficace que Mad1*DNKR pour inhiber la croissance des cellules A549 (Adénocarcinome pulmonaire humain (NSCLC) KRAS-activé (Patent N° WO 2017/185171 A1, 2017). Vu leurs propriétés pharmacocinétiques distinctes, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de Max* par rapport à Mad1*DNKR dans un modèle de cancer *in vivo*.

4.3.1.2 Mad1*DNKR

L'expérience de demi-vie plasmatique *ex vivo* avec Mad1*DNKR indique la période de temps nécessaire pour évaluer adéquatement la pharmacocinétique *in vivo*. D'autres expériences *ex vivo* seraient pertinentes pour étudier d'autres mécanismes de clairance, comme avec des homogénats de reins et de foie. D'autres paramètres physiologiques pourraient être explorés. L'incubation de Mad1*DNKR avec de l'albumine avant l'incubation dans le plasma pourrait éclairer à propos de l'influence de la liaison aux protéines plasmatiques sur la dégradation. À elle seule, la demi-vie plasmatique de Mad1*DNKR indique que sa stabilité n'est pas optimale pour inhiber c-Myc en dimérisant avec le facteur de transcription Max, dans le noyau des cellules dans un organisme vivant.

La distribution d'une protéine dans un organisme est plus lente qu'avec une petite molécule chimique car elle ne traverse pas les barrières physiologiques par simple diffusion. (Section 1.3.2) Il sera donc nécessaire d'optimiser la structure de Mad1*DNKR pour allonger sa durée de vie, tel que mentionné à la section suivante.

4.3.1.3 Site de clivage

L'élucidation de la séquence du premier produit de dégradation de Mad1*DNKR est la clef pour optimiser la stabilité de la molécule. Le site de clivage, à l'extrémité est entouré des acides aminés KNRR. Cette séquence est un motif reconnu par l'endopeptidase sous-composante CS1 (3.4.21.42), une protéase circulant dans le sang (Werle & Bernkop-Schnürch, 2006). Pour augmenter la stabilité des dérivés de Mad1*DNKR, il faut changer les acides aminés adjacent au site de clivage, en s'inspirant de la séquence de Max* par exemple. Les changements apportés ne doivent pas interférer avec le mécanisme d'action même si le site de clivage est en aval du domaine basique impliqué dans la liaison à l'ADN. Finalement, des modifications de la séquence de Mad1*DNKR pour le rendre plus stable peuvent être inspirées de la séquence de Max*. Pour ce faire, il faudrait d'abord comparer les acides aminés autour du site de clivage de Mad1*DNKR avec la région correspondante sur Max* afin de les substituer judicieusement. Après avoir choisi des variantes de la séquence de Mad1*DNKR, il faut les générer en bactéries puis évaluer leur efficacité *in vivo* (section 1.2.2) et leur stabilité plasmatique *ex vivo*. Ces travaux sont présentement en cours au laboratoire de Pierre Lavigne. Différentes variantes de Mad1*DNKR ont été conçus et synthétisés. Leur efficacité *in vivo* et leur stabilité *ex vivo* sont présentement étudiés.

Mad1*DNKR
MSRSTHNEME KNRR AHLRLS LKKLKRLVPL GPSSRHTTL SLLTKAKLHI KKLEDSNRKA IHQIDQLQRE QRHLKRQLEK LGGSGC
Max*
MADKRAHHNA LERKRR DHIK DSFHSRLRDSV PSLQGEKASR AQILDKATEY IQYMRRKNHT HQQDIDDLKR QNALLEQQVR ALEGSGC

Figure 35. Séquences des acides aminés des B-HLH-LZ de Max* et de Mad1*DNKR.

Haut : La portion en rouge de la séquence correspond au fragment clivé en premier par les enzymes du plasma. Bas : la portion en rouge est une section équivalente sur Max*, également au niveau de la région basique

4.3.2 Métabolisme in vivo

4.3.2.1 Demi-vie pharmacocinétique vs demi-vie plasmatique

Les valeurs de demi-vie pharmacocinétique *in vivo* remettent en question celles de demi-vie plasmatique *ex vivo* (section 3.3.1) qui suggéraient une dégradation de Mad1*DNKR après 15 minutes. L'utilisation de l'appareil Fusion Pulse pourrait expliquer cette différence. Tel qu'expliqué à la section 2.1.2, le film radiographique pour l'expérience de digestion plasmatique ne permettait pas de détecter l'écart de valeur en jeu. Une exposition plus longue du film ferait émerger les bandes des échantillons de Mad1*DNKR incubés plus de 15 minutes, et entraînerait probablement la saturation des bandes avant ce temps. L'appareil Fusion Pulse avec son exposition calculée permet de distinguer chaque échantillon dans un écart qui permet leur comparaison. D'autres facteurs ont pu influencer la demi-vie biologique par rapport à la demi-vie plasmatique. La liaison non covalente et non spécifique de Mad1*DNKR sur les composantes de l'organisme – protéines plasmatiques, endothéliums, globules sanguins, compartiments non représentés par le plasma seul – peut diminuer la fraction libre disponible pour les enzymes protéolytiques (Meibohm, 2013). L'hydrophobicité des régions hélice-boucle-hélice (HLH) et zipper à

leucine (LZ) de la protéine pourraient contribuer à l'adsorption à des membranes cellulaires ou des lipoprotéines circulantes. De même, la charge positive des acides aminés du domaine basique (b) pourrait contribuer à la liaison à des glycoprotéines membranaires ou matricielles chargées négativement.

La demi-vie d'une même molécule peut être différente dans un autre compartiment que la circulation sanguine. Si mad1*DNKR y est moins dégradé, l'organe ou le tissu agit comme un réservoir, relarguant plus Mad1*DNKR qu'en aurait contenu le sang à cet instant. Inversement, le foie et le rein pourraient dégrader plus rapidement la fraction de Mad1*DNKR s'y trouvant.

Ainsi, différentes valeurs de demi-vie ont été déduites des immunobuvardages effectués pour chaque animal. Ces valeurs fluctuent largement, autant de par la variabilité intrinsèque des modèles *in vivo* que la reproductibilité des immunobuvardages de type Western, ce qui inspire la retenue de commenter la valeur moyenne calculée ($5,9 \pm 4,4$ minutes).

4.3.2.2 *Modèle pharmacocinétique*

L'analyse mono-exponentielle représentant la variation de concentration sanguine de Mad1*DNKR correspond au modèle monocompartimental. Un modèle bicompartimental représenterait mieux le devenir de notre protéine dans l'organisme puisque sa clairance dans le sang après l'administration est plus élevée qu'après l'atteinte de l'état d'équilibre. Dans la première phase d'un tel modèle, le transfert du sang aux organes fait diminuer rapidement la concentration. À l'atteinte d'un pseudo-équilibre dans les échanges, la deuxième phase possède une demi-vie plus longue. En continuant les prélèvements au-delà d'une heure, aurions pu déceler une phase beta dans notre courbe d'élimination. Le volume de sang à prélever à chaque temps limitait cette manoeuvre. Avec une méthode de quantification uniforme permettant le regroupement des données, il serait possible de combiner les concentrations plasmatiques de plusieurs expériences et générer une courbe tenant en compte plus de valeurs. L'absence de données au-delà de ce temps nous empêche de calculer une demi-vie beta impliquée par le modèle pharmacocinétique

bicompartimental. La demi-vie que nous avons calculé selon une courbe de dégradation mono-exponentielle correspond plutôt au taux de disparition de la phase alpha d'une courbe de dégradation biexponentielle.

4.3.2.3 Autres sources de variabilité expérimentale

La méthode expérimentale, notamment le prélèvement sanguin, a été optimisée au fil des reprises de l'expérience. Un grand soin est nécessaire pour éviter la coagulation du sang avant l'extraction du plasma. Le sang coagulé peut créer des agrégats où Mad1*DNKR resterait piégé, réduisant ainsi la concentration mesurée. Le transfert du sang du socle de l'aiguille au tube sur glace, ainsi que le mélange à l'EDTA, ont été optimisés au fil des expériences. La présence inconstante du segment clivé visible dans quelques échantillons pourrait être expliquée par la variation dans l'arrêt de la coagulation – donc de la dégradation enzymatique de Mad1*DNKR – d'une expérience à l'autre.

La canulation imparfaite chez certains animaux peut mener à un dépôt de la dose autour de la veine caudale, ce qui ralentirait l'absorption. D'autres difficultés techniques rendaient les temps de prélèvements inconstants.

La dégradation de Mad1*DNKR est analysée pour chaque souris sur un même gel, et aucune quantification n'a été utilisée pour regrouper les valeurs de tous les animaux pour un même temps. Cela fit ressortir la variabilité inter-animale typique des expériences *in vivo*. (Joyce et al., 2014). Des différences intrinsèques entre les animaux peuvent être en cause, de même qu'une inconstance de l'anesthésie et de la température du tapis chauffant, ajusté en continu. Une moyenne plus significative serait donc obtenue avec plusieurs itérations de l'expérience sur autant d'animaux.

4.3.2.4 Améliorations à apporter

La maîtrise des manipulations de l'expérience est un préalable crucial. L'expérimentateur devrait s'entraîner pour les canulations, le prélèvement sanguin et la séparation du plasma, avec des animaux pouvant servir de contrôles négatifs.

Ensuite, des animaux de 30 g, plutôt que 20 g, permettraient de faire plus de prélèvements. Lorsque la survie de l'animal est nécessaire, un maximum de 10% du volume sanguin circulant d'un animal peut être retiré en une journée sans affecter ses fonctions vitales. (Morton et al., 1993). Il est recommandé de ne pas prélever plus de 1% du volume circulant, donc 20 μ L par prélèvement pour une souris de 25 à 30 g (NIH, 2015). Finalement, la combinaison des expériences de métabolisme et de biodistribution permettrait de corréler l'exposition à Mad1*DNKR avec sa distribution dans les organes.

Ensuite, prélever un volume de sang inférieur serait plus rapide. Il s'agirait de le diluer dans la même quantité d'EDTA pour obtenir assez d'échantillons pour reproduire les mesures. Des capillaires enduits d'EDTA et calibrés pour les prélèvements sanguins rendraient la procédure plus efficace (p. ex. Tubes Minivette POTC 20 μ L de Starsted ; micropipettes capillaires calibrées de Drummond Scientific).

Pour l'analyse, une méthode de quantification comme la spectrométrie de masse, avec une courbe standard et des répliques (section 4.1.2) serait primordiale. Dans l'immunobuvardage, le nombre de puits dans un SDS-PAGE empêche d'ajouter d'une courbe standard adjacente aux échantillons. La spectrométrie de masse et une méthode de prélèvement plus uniforme permettraient la distinction du segment clivé.

L'analyse des résultats n'est pas la même qu'une expérience *in vitro* ou *ex vivo* qui nécessite quelques répétitions pour valider sa fiabilité. L'analyse devrait être faite avec les moyennes des valeurs obtenues avec toutes les souris, par temps de mesure. Ainsi, la valeur de demi-vie résultante traduirait la variabilité de l'expérience. De plus, un plus grand nombre de prélèvements sur une heure serait pertinent pour calculer avec plus d'exactitude la demi-vie après la distribution de Mad1*DNKR dans les tissus.

4.4 Biodistribution

4.4.1 Détection dans les organes ciblés

Tout d'abord, la présence de Mad1*DNKR dans le foie et le rein s'explique par les mécanismes d'élimination des protéines de ces organes. Dans le rein, les protéines de poids

moléculaire inférieur à 30 kDa, sont facilement éliminées de l'organisme par la filtration glomérulaire. La charge est également un facteur déterminant, les molécules non-chargées ou chargées négativement étant sélectivement moins filtrées que les molécules chargées positivement (Meibohm, 2013). Mad1*DNKR, avec sa charge positive et son poids d'environ 10 kDa, traverserait donc facilement les glomérules. Dans les tubules rénaux, les protéines sont rapidement dégradées par des peptidases membranaires, ce qui explique qu'aucune trace de Mad1*DNKR n'ait été détecté dans l'urine. Dans le foie, les protéines exogènes et endogènes sont dégradées par protéolyse et les acides aminés résultants sont réutilisés par l'organisme. Pour ce faire, les cellules hépatiques internalisent les protéines par pinocytose ou par endocytose, deux mécanismes soupçonnés d'être utilisés par Mad1*DNKR sur les cellules cibles. D'ailleurs, le mécanisme d'entrée dans les cellules de Max* fut élucidé lors des expériences démontrant son effet sur les cellules cancéreuses (Montagne et al., 2012) (Section 1.3.2). La quantité et la perméabilité des capillaires des poumons pourrait expliquer le faible signal associable à Mad1*DNKR sur les immunobuvardages. Ce signal ne dépasse pas le signal non-spécifique associé aux protéines de poids moléculaires supérieurs. Sans une méthode de détection plus spécifique, il est difficile de statuer avec certitude sur la présence de Mad1*DNKR dans les poumons (Kim & Malik, 2003).

4.4.2 Influence de la demi-vie

Le principal mécanisme d'élimination de Mad1*DNKR semble être la protéolyse dans le plasma. Celle-ci est probablement trop rapide pour permettre l'atteinte de niveaux détectables dans les autres tissus. Tel que mentionné à la section 1.1.3.4, la diffusion passive dans les interstices des capillaires et la migration trans-cellulaire sont les mécanismes probables de la biodistribution de Mad1*DNKR. L'internalisation de Max* dans les cellules HeLa survient dans les 20 minutes après l'ajout de la protéine dans le milieu de culture. Conséquemment, la dégradation rapide de Mad1*DNKR dans le plasma constitue une barrière à sa biodistribution par voie transcellulaire.

4.4.3 Limites expérimentales

Quant à la méthode expérimentale, la plus grande limite de notre expérience est la méthode de détection et de quantification de Mad1*DNKR, soit l'immunobuvardage de type Western. Tout d'abord, les concentrations de Mad1*DNKR dans les tissus autres que le foie et les reins sont potentiellement très faibles. Le volume maximal des puits du SDS-PAGE limite la quantité totale pouvant être détectée. Ensuite, pour quantifier précisément Mad1*DNKR dans les organes, il était important d'inclure sur le gel une courbe standard couvrant les concentrations soupçonnées (section 2.4.7). L'optimisation de cet aspect a été un défi qui reste à relever. Les résultats n'étaient pas reproductibles, et les paramètres variés dans ce but n'influençaient pas la spécificité et la sensibilité. Réutiliser les échantillons mélangés au Laemmli-Urée d'une expérience à l'autre fut une erreur. En effet, bien que cette solution dénature les protéines avant l'électrophorèse (Figure 14), l'urée catalyse la formation de liens covalents entre les protéines lorsque les échantillons sont chauffés plus d'une fois. Malgré la préparation de nouveaux échantillons, les résultats sont demeurés inconstants. Ensuite, la spécificité de l'anticorps primaire, Anti-Mad-DV, laisse à désirer. Son origine polyclonale, qui permet de détecter facilement différents mutants de Mad1*DNKR, est un désavantage lorsqu'il faut distinguer ce dernier parmi les nombreuses protéines d'un homogénat protéique d'organe. Par conséquent, le signal de Mad1*DNKR est considérablement rapproché des signaux dus aux liaisons non-spécifique à l'anticorps. Le plasma ne contient pas les protéines cellulaires et tissulaires des homogénats d'organe donc la détection de Mad1*DNKR dans les échantillons de plasma est plus spécifique (au niveau de la méthode).

4.3.4 Améliorations suggérées

4.3.4.1 Méthode de détection

Pour améliorer l'expérience, une méthode de détection fiable et sensible comme un ELISA ou la spectrométrie de masse serait idéale. La spectrométrie de masse serait particulièrement utile puisqu'elle nécessiterait moins d'ajustement en fonction de la

matrice de l'échantillon et des nouveaux composés utilisés, contrairement à l'ELISA. De plus, la nécessité de quantifier fiablement la concentration de Mad1*DNKR appuie cette méthode puisque l'utilisation d'une courbe standard est très peu pratique en immunobuvardage de type Western. Finalement, il existe de nombreuses méthodes pour mesurer la biodistribution d'une molécule, notamment avec un traceur radioactif (Lee & Pardridge, 2001). L'utilisation d'une protéine marquée a comme inconvénient de ne pas permettre la distinction entre la protéine entière marquée, un fragment de celle-ci, ou le radiotraceur seul. Pour pondérer ce résultat, la mesure de la protéine native par une autre méthode (spectrométrie de masse ou ELISA) est nécessaire. Par exemple, l'utilisation de la TEP apporte un profil dynamique, mais n'agrément pas la quantification faite par spectrométrie de masse.

4.3.4.2 Combinaison des expériences et répétitions

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les expériences d'efficacité, de métabolisme in vivo et de biodistribution pourraient utiliser les mêmes animaux. Cela réduirait le nombre d'animaux utilisés. D'emblée, certains animaux contrôles de l'expérience d'efficacité étaient utilisés pour l'expérience de biodistribution et la concentration de Mad1*DNKR était mesurée dans les tumeurs. Bien que le volume de sang prélevé dans l'expérience de demi-vie biologique puisse affecter le métabolisme de l'animal et la biodistribution, il serait pertinent d'effectuer cette expérience sur les mêmes animaux. Une vérification de la variation des résultats pourrait être faite sur d'autres animaux. Une telle combinaison permettrait de corrélérer la variation de la concentration sanguine avec la concentration détectée dans les organes, pour une seule souris.

4.5 Efficacité

4.5.1 Modèle Métastatique

L'expérience d'efficacité de Mad1*DNKR en modèle de cancer métastatique et sous-cutané se solde par un résultat négatif. Nous devons conclure que Mad1*DNKR ne freine pas la

croissance des tumeurs puisqu'il est impossible de distinguer une différence entre les charges tumorales des animaux du groupe traité et celles du groupe contrôle. Toutefois, l'expérience comporte plusieurs problèmes méthodologiques.

L'érosion des groupes, à cause de l'agressivité de la lignée cellulaire inoculée, a diminué la puissance statistique. L'utilisation d'un modèle moins accablant pour démontrer une réponse thérapeutique paraît incontournable.

La combinaison des métastases et des tumeurs sous-cutanées complique le suivi de la charge tumorale. Des facteurs propres à chaque méthode font varier la bioluminescence émise par les tumeurs : la profondeur et l'environnement immédiat pour les métastases; la présence de poil, et l'état de la peau pour les tumeurs sous-cutanées. De plus, ces deux types de tumeurs croissent à des rythmes différents. Il s'agissait donc d'un nouveau modèle de cancer que nous aurions dû caractériser avant d'utiliser.

Le délai d'attente était probablement trop long pour qu'une dose unique de traitement ait un effet sur les tumeurs. Les métastases commençaient à paraître en imagerie alors que les tumeurs sous-cutanées encombraient les souris. Pour voir l'influence d'un composé avec une courte demi-vie sur le développement de tumeurs, il aurait fallu l'administrer plus tôt. Justement, cette courte pharmacocinétique montrant une disparition rapide du composé limite l'exposition des tumeurs, donc certainement l'efficacité. Finalement, en l'absence de contrôle positif, il se peut qu'aucun effet statistiquement significatif ne ressorte du modèle choisi pour les raisons énumérées ci-haut.

La souffrance des souris due aux métastases de cellules 4T1 est disproportionnée quant aux besoins de l'hypothèse de base. Ce fut la première utilisation du modèle développé par Mme Sikpa dans un essai comparatif, et la première expérience d'efficacité in vivo des équipes de Pr Lepage et de Pr Lavigne. Les leçons tirées ont servi à concevoir le modèle de tumeurs sous-cutanées de l'expérience suivante.

4.5.2 Modèle sous-cutané

Le résultat de l'expérience d'efficacité avec le modèle sous-cutané ne montre pas que six doses de 24,3 mg/kg de Mad1*DNKR parviennent à freiner la croissance des tumeurs sous-

cutanées. Toutefois, des problèmes méthodologiques, comme avec l'expérience en modèle métastatique, empêchent de se prononcer sur l'efficacité du traitement.

L'érosion des groupes, cette fois-ci en raison d'une réaction anaphylactique au traitement, a diminué la puissance statistique de l'expérience. La croissance des tumeurs était hautement variable. Certaines tumeurs devenaient volumineuses rapidement et d'autres demeuraient petites, et ce malgré une minutie appliquée lors de l'implantation. Le rythme de croissance des tumeurs présentait une importante variation inter-animal et intra-animal. Effectivement, lorsque les tumeurs étaient visibles sur une même souris, une grosse tumeur croissait plus rapidement qu'une petite.

Lors de l'expérience, l'utilisation d'une nouvelle caméra et d'un logiciel d'exploitation en pleine mise au point causa de nombreux problèmes :

- Il était impossible de prendre des images avec une exposition de plus d'une minute, ce qui empêchait l'analyse de tumeurs dont le signal ne dépassait pas le bruit de fond.
- La réponse de l'appareil au logiciel était déficiente : les images précédant l'injection de luciférine montraient un faible signal lumineux, absent des acquisitions subséquentes.

L'épilation des animaux affectait directement l'expérience. Faite tout au long de l'expérience, l'épilation causait des plaies sur certaines tumeurs sous-cutanées qui affectaient le signal. Des galles se formaient sur les tumeurs et occultaient la bioluminescence des cellules en dessous. Épiler une seule fois au début de l'expérience ne réglait pas le problème, puisque le pelage ne poussait pas également sur les souris et finissait par affecter le signal. L'influence plus constante d'un pelage intact aurait engendré moins de variabilité.

Nous avons dû utiliser un deuxième lot de luciférine durant l'expérience. Leurs propriétés physico-chimiques semblaient varier (solubilité, apparence, couleur). Le lot utilisé vers la fin de l'expérience donnait un signal plus soutenu que le précédent.

4.5.3 Réactions au composé

L'administration répétée de Mad1*DNKR a provoqué ce qui semble être des réactions anaphylactiques chez les souris traitées. À partir de la quatrième dose, certaines devenaient

rouges et suffoquaient jusqu'à en mourir. Les souris du groupe contrôle ne présentaient pas ce phénomène, même si le PBS utilisé pour l'injection était manié dans les mêmes conditions. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène est que les contaminants de la solution de Mad1*DNKR, soit des traces de bactéries utilisées pour synthétiser le peptide, ont agi comme sensibilisateur de l'organisme à Mad1*DNKR. Les souris traitées auraient donc développé une hypersensibilité immunitaire à notre composé à cause de sa formulation. Une réaction immunitaire à un composé diminue nécessairement son efficacité. Bien sûr, s'il y a une réaction d'hypersensibilité comme un choc anaphylactique, la survie des animaux traités est compromise par rapport aux animaux contrôles. Toutefois, dans la plupart des cas, la production d'anticorps contre une protéine thérapeutique limite augmente sa clairance et limite son efficacité.

4.5.4 Analyse des résultats

L'analyse des résultats aurait pu être anticipée différemment. La méthode utilisée, soit les t-test multiples, compare les charges tumorales des deux groupes à un seul temps d'analyse, plutôt que de faire état de la tendance de chaque groupe à travers le temps. Il serait intéressant de voir si l'administration de doses répétées de Mad1*DNKR influence le rythme de croissance des tumeurs vis-à-vis le groupe contrôle, plutôt que la taille à un temps donné.

De plus, il serait possible que les valeurs de bioluminescence suivent une distribution log-normale plutôt que normale. Cela concorderait avec le fait qu'une population de cellules en division croît exponentiellement, un peu comme dans nos tumeurs. Aussi, cela expliquerait la variabilité des valeurs vers la fin de l'expérience.

Le test statistique, le t-test multiple, a été effectué en assumant au préalable une distribution normale des valeurs. Avec GraphPad Prism, un test de normalité effectué et de log-normalité révèle que les charges tumorales du groupe métastatique présentent une distribution log-normale. Le groupe sous-cutané ne présente ni l'un, ni l'autre. Il va de soi qu'une analyse non-paramétrique (analyse de rangs Wilcoxon), moins puissante, procurerait le même résultat négatif. Néanmoins, pour étudier la distribution des valeurs

de charges tumorales, il serait préférable d'avoir un nombre de valeurs plus grand que celui obtenu.

Finalement, lors de l'expérience avec les tumeurs sous-cutanées, les obstacles méthodologiques – le temps d'exposition limité lors des acquisitions d'images, la croissance imprévisible des tumeurs, le bruit de fond de la nouvelle caméra – ont eu pour effet que la charge tumorale pré-traitement, nécessaire pour normaliser, était indiscernable du bruit de fond par notre pipeline. Pourtant, sur les images analysées, certaines tumeurs étaient bien visibles. Nous avons donc normalisé les charges tumorales avec la première valeur obtenue, même si elle était post-traitement.

4.5.5 Suggestions

À la lumière de ces conclusions, le meilleur modèle pour évaluer l'efficacité de Mad1*DNKR sur la croissance des tumeurs *in vivo* serait des greffes sous-cutanées chez des souris nues immunodépourvues, avec une lignée susceptible *in vitro*. Tout d'abord, la question du pelage serait résolue. Ensuite, il n'y aurait pas de risque de réaction immunitaire au composé et le volume des tumeurs pourrait être mesuré avec des étrières. Un groupe comparatif avec un traitement cytotoxique utilisé en clinique serait utile pour confirmer la réponse du modèle. Finalement, pour palier à la variabilité de l'implantation des tumeurs, il serait plus pratique de commencer le traitement à partir d'un seuil de taille plutôt qu'après un délai défini. Cela éviterait de commencer le traitement après un délai où les tumeurs ne génèrent pas un signal mesurable au-delà du bruit de fond.

4.6 Conclusion

L'utilisation de b-HLH-LZ optimisés pour inhiber c-Myc dans le noyau des cellules cancéreuses est une stratégie ambitieuse, mais prometteuse. Plutôt que d'affecter une composante singulière de la signalisation ou un récepteur, elle bouleverse la dynamique d'interaction d'un réseau de facteur de transcription dérégulé par l'excès, et non la dysfonction, de c-Myc, une cible non redondante, véritable pivot de la mécanique moléculaire du cancer. Les protéines développées par le Pr Lavigne ont plusieurs caractéristiques importantes pour une thérapie efficace. Le fait qu'il s'agisse d'une protéine conçue rationnellement procure une spécificité pour la cible bien plus grande qu'avec une petite molécule. De plus, la propriété de pénétrer dans les cellules et d'atteindre le noyau est étonnante pour une protéine.

De nombreux défis restent à relever pour démontrer le potentiel thérapeutique de Mad1*DNKR. Son optimisation par génie protéique, dans le but d'obtenir une plus longue demi-vie, rendra plus pratique sa caractérisation en modèle animal.

Ce projet de maîtrise fut la première tentative de transférer une découverte provenant de la recherche fondamentale vers un développement pharmaceutique, et nous a permis d'identifier un certain nombre de points à améliorer dans le but d'atteindre cet objectif.

5. Liste des références

- Adams, J. U., & O'Connor, C. (2010). Essentials of Cell Biology. Consulté 13 août 2019, à l'adresse NPG Education website: <https://www.nature.com/scitable/ebooks/cntNm-14749010/>
- Allen-Petersen, B. L., & Sears, R. C. (2019). Mission Possible: Advances in MYC Therapeutic Targeting in Cancer. *BioDrugs*. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00370-5>
- Amgen Canada Inc. (2018). *Neupogen*. Consulté à l'adresse <https://www.amgen.ca/products/~media/a9ddd99af4b44bbd890222e34be4f7aa.as-hx>
- AMGEN CANADA INC., & Immunex Corporation. (2018). *Enbrel, Product Monograph*. Consulté à l'adresse <https://www.amgen.ca/products/~media/5d0a40b2b8774fb5994190f97daf7fbd.as-hx>
- Annibali, D., Whitfield, J. R., Favuzzi, E., Jauset, T., Serrano, E., Cuartas, I., ... Soucek, L. (2014). Myc inhibition is effective against glioma and reveals a role for Myc in proficient mitosis. *Nature Communications*, 5(4632), 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms5632>
- Arakawa, T., & Philo, J. S. (2013). *Biophysical and Biochemical Analysis of Recombinant Proteins BT - Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications* (D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm, Éd.). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_2
- Balathasan, L., Beech, J. S., & Muschel, R. J. (2013). Ultrasonography-guided intracardiac injection: An improvement for quantitative brain colonization assays. *American Journal of Pathology*, 183(1), 26-34. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.003>
- Baumann, A. (2008). Preclinical development of therapeutic biologics. *Expert opinion on drug discovery*, 3(3), 289-297. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.3.289>
- Baumann, A. (2009). Nonclinical development of biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, 14(23-24), 1112-1122. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.09.013>
- Beaulieu, M.-E., Jauset, T., Massó-Vallés, D., Martínez-Martín, S., Rahl, P., Maltais, L., ... Soucek, L. (2019). Intrinsic cell-penetrating activity propels Omomyc from proof of concept to viable anti-MYC therapy. *Science translational medicine*, 11(484). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar5012>
- Bemmo, A., Dias, C., Rose, A. A. N. R., Russo, C., Siegel, P., & Majewski, J. (2010). Exon-Level transcriptome profiling in murine breast cancer reveals splicing changes specific to tumors with different metastatic abilities. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011981>
- Böttger, R., Hoffmann, R., & Knappe, D. (2017). Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PLoS ONE*, 12(6), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178943>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>

- Bradner, J. E., Hnisz, D., & Young, R. A. (2017). Transcriptional Addiction in Cancer. *Cell*, 168(4), 629-643. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.013>
- Burnett, R. M., Craven, K. E., Krishnamurthy, P., Goswami, C. P., Badve, S., Crooks, P., ... Nakshatri, H. (2015). Organ-specific adaptive signaling pathway activation in metastatic breast cancer cells. *Oncotarget*, 6(14). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3707>
- Cabanero, M., Sangha, R., Sheffield, B. S., Sukhai, M., Pakkal, M., Kamel-Reid, S., ... Tsao, M. S. (2017). Management of EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: practical implications from a clinical and pathology perspective. *Current Oncology*, 24(2), 111. <https://doi.org/10.3747/co.24.3524>
- Castells, M. C. (2015). Anaphylaxis to chemotherapy and monoclonal antibodies. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35(2), 335-348. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.01.011>
- Chambers, E. E. (2013). Quantitative Analysis of Therapeutic and Endogenous Peptides using LC/MS/MS Methods. Dans *Characterization of Protein Therapeutics using Mass Spectrometry* (p. 59-94). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7862-2_2
- Chen, B. J., Wu, Y. L., Tanaka, Y., & Zhang, W. (2014). Small molecules targeting c-Myc oncogene: Promising anti-cancer therapeutics. *International Journal of Biological Sciences*, 10(10), 1084-1096. <https://doi.org/10.7150/ijbs.10190>
- Chen, G. (2013). *Characterization of Protein Therapeutics using Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7862-2>
- Chin, L., Schreiber-Agus, N., Pellicer, I., Chen, K., Lee, H. W., Dudast, M., ... DePinho, R. A. (1995). Contrasting roles for Myc and Mad proteins in cellular growth and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 8488-8492. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8488>
- Ciriello, G., Miller, M. L., Aksoy, B. A., Senbabaoglu, Y., Schultz, N., & Sander, C. (2013). Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics*, 45(10), 1127-1133. <https://doi.org/10.1038/ng.2762>
- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., & Eisenman, R. N. (2014). An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(1), 1-24. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014357>
- Crommelin, D. J. A., Sindelar, R. D., & Bernd, M. (2013). Pharmaceutical Biotechnology. Dans D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm (Éd.), *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology: Seventh Edition*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0>
- Cultraro, C. M., Bino, T., & Segal, S. (1997). Function of the c-Myc antagonist Mad1 during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2353-2359. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.5.2353>
- Dang, C. V. (2013). MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014217>
- Dang, C. V., Reddy, E. P., Shokat, K. M., & Soucek, L. (2017). Drugging the « undruggable » cancer targets. *Nature Reviews Cancer*, 17(8), 502-508. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.36>
- Dang, C. V. (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell*, 149(1), 22-35.

- <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.02.012>. Investigations
- Dimitrov, D. S. (2012). Therapeutic proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 899, 1-26. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_1
- Diolaiti, D., McFerrin, L., Carrol, P., & Eisenman, R. N. (2015). Functional Interactions Among Members of the MAX and MLX Transcriptional Network During Oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(5), 484-500. <https://doi.org/10.1038/nbt.3121>.ChIP-nexus
- Direction générale de la fabrication et des sciences de la vie Innovation Sciences et Développement économique Canada. (s. d.). Profil de l'industrie pharmaceutique - Industrie canadienne - Sciences de la vie. Consulté 25 juin 2019, à l'adresse https://www.ic.gc.ca/eic/site/lsg-pdsv.nsf/fra/h_hn01703.html
- Farrell, A. S., & Sears, R. C. (2014). MYC degradation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a014365>
- Felsher, D. W. (2010). MYC Inactivation Elicits Oncogene Addiction through Both Tumor Cell-Intrinsic and Host-Dependent Mechanisms. *Genes & cancer*, 1(6), 597-604. <https://doi.org/10.1177/1947601910377798>
- Fletcher, S., & Prochownik, E. V. (2015). Small-molecule inhibitors of the Myc oncoprotein. *Biochimica et biophysica acta*, Vol. 1849, p. 525-543. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.005>
- Gabay, M., Li, Y., & Felsher, D. W. (2014). MYCActivation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 4, 1-13.
- García-Gutiérrez, L., Delgado, M. D., & León, J. (2019). MYC Oncogene Contributions to Release of Cell Cycle Brakes. *Genes*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/genes10030244>
- Gassmann, M., Grenacher, B., Rohde, B., & Vogel, J. (2009). Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. *Electrophoresis*, 30(11), 1845-1855. <https://doi.org/10.1002/elps.200800720>
- Giardino Torchia, M. L., & Ashwell, J. D. (2018). Getting MAD at MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40), 9821-9823. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813867115>
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P., & Eisenman, R. N. (2000). The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*, 16, 653-699. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.653>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, J. (2013). Practical Guide to ELISA Development. Dans *The Immunoassay Handbook* (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-097037-0.00025-7>
- Hnasko, R., Lin, A., Mcgarvey, J. A., & Stanker, L. H. (2011). A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(4), 726-731. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.005>
- Hsieh, A. L., Walton, Z. E., Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2015). MYC and metabolism on the path to cancer. *Seminars in cell development biology*, 43(4), 11-12. <https://doi.org/10.1038/nbt.3121>.ChIP-nexus
- Hurlin, P. J., Ayer, D. E., Grandori, C., & Eisenman, R. N. (1994). The Max transcription factor

- network: involvement of Mad in differentiation and an approach to identification of target genes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 59, 109-116.
- Industrie du Canada. (2013). *L'industrie pharmaceutique canadienne et ses perspectives*. <https://doi.org/lu-44-93/2014F-PDF>
- Institut Canadien d'Information sur la Santé. (2017). *Dépenses en médicaments prescrits au Canada 2017 : regard sur les régimes publics d'assurance-médicaments*.
- Ivanov, A. A., Khuri, F. R., & Fu, H. (2013). Targeting protein-protein interactions as an anticancer strategy. *Trends in pharmacological sciences*, 34(7), 393-400. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.04.007>
- Jain, M., Arvanitis, C., Chu, K., Dewey, W., Leonhardt, E., Trinh, M., ... Felsher, D. W. (2002). Sustained Loss of a Neoplastic Phenotype by Brief Inactivation of MYC. *Science*, 297(July), 102-104. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000309153.38172.41>
- Jambunathan, K., & Galande, A. K. (2014). Sample collection in clinical proteomics- Proteolytic activity profile of serum and plasma. *Proteomics - Clinical Applications*, 8(5-6), 299-307. <https://doi.org/10.1002/prca.201300037>
- Joyce, A. P., Wang, M., Lawrence-Henderson, R., Fillietaz, C., Leung, S. S., Xu, X., & O'Hara, D. M. (2014). One mouse, one pharmacokinetic profile: Quantitative whole blood serial sampling for biotherapeutics. *Pharmaceutical Research*, 31(7), 1823-1833. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1286-y>
- Kalkat, M., De Melo, J., Hickman, K. A., Lourenco, C., Redel, C., Resetca, D., ... Penn, L. Z. (2017). MYC deregulation in primary human cancers. *Genes*, 8(6), 2-30. <https://doi.org/10.3390/genes8060151>
- Karlsson, A., Deb-Basu, D., Cherry, A., Turner, S., Ford, J., & Felsher, D. W. (2003). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9974-9979. <https://doi.org/10.1073/pnas.1732638100>
- Kastle Therapeutics Llc. (2016). KYNAMR (mipomersen sodium injection). *Product Monograph*, 1-15.
- Khalil, A., & Jameson, M. (2013). Subcutaneous Administration of D-Luciferin is an Effective Alternative to Intraperitoneal Injection in Bioluminescence Imaging of Xenograft Tumors in Nude Mice. *International Scholarly ...*, 2013(lv). Consulté à l'adresse <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/689279/abs/>
- Khan, D. A. (2016). Hypersensitivity and immunologic reactions to biologics: opportunities for the allergist. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 117(2), 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.05.013>
- Kim, K.-J., & Malik, A. B. (2003). Protein transport across the lung epithelial barrier. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284(2), L247-L259. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00235.2002>
- Kintzing, J. R., Filsinger Interrante, M. V., & Cochran, J. R. (2016). Emerging Strategies for Developing Next-Generation Protein Therapeutics for Cancer Treatment. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(12), 993-1008. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.005>
- Kumari, A., Folk, W. P., & Sakamuro, D. (2017). The Dual Roles of MYC in Genomic Instability and Cancer Chemoresistance. *Genes*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/genes8060158>

- Lavigne, P., Montagne, M., & Maltais, L. (2017). *Patent N° WO 2017/185171 Al*.
- Lee, H. J., & Pardridge, W. M. (2001). Pharmacokinetics and delivery of tat and tat-protein conjugates to tissues in vivo. *Bioconjugate Chemistry*, 12(6), 995-999. <https://doi.org/10.1021/bc0155061>
- Lee, B. II, & Min, J. (2010). Molecular Imaging Using Bioluminescence. *The Open Nuclear Medicine Journal*, 2, 157-165.
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2011). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Lerondel, S., & Le Pape, A. (2013). Bioluminescence Imaging in Rodents: When Light Illuminates Cancer Research. *Current Molecular Imaging*, 2(1), 18-29. Consulté à l'adresse <http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmi/2013/00000002/00000001/art00004>
- Li, Y., Choi, P. S., Casey, S. C., Dill, D. L., & Felsher, D. W. (2014). MYC through miR-17-92 Suppresses Specific Target Genes to Maintain Survival, Autonomous Proliferation and a Neoplastic State. *Cancer cell*, 26(2), 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.014>
- Ling, X., & Arlinghaus, R. B. (2005). Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Research*, 65(7), 2532-2536. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2425>
- Link, J. M., & Hurlin, P. J. (2014). The activities of MYC, MNT and the MAX-interactome in lymphocyte proliferation and oncogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 554-562. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.004>
- Lockman, P. R., Mittapalli, R. K., Taskar, K. S., Rudraraju, V., Gril, B., Bohn, K. A., ... Smith, Q. R. (2010). Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(23), 5664-5678. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1564>
- Lorenzin, F., Benary, U., Baluapuri, A., Walz, S., Jung, L. A., von Eyss, B., ... Wolf, E. (2016). Different promoter affinities account for specificity in MYC-dependent gene regulation. *eLife*, 5(JULY), 2015-2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.15161>
- Lüscher, B., & Vervoorts, J. (2012). Regulation of gene transcription by the oncoprotein MYC. *Gene*, 494(2), 145-160. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.12.027>
- Lüscher, & Larsson. (1999). The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation. *Oncogene*, 18(19), 2955-2966. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202750>
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., ... Valastyan, S. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *12(3)*, 247-256. <https://doi.org/10.1038/ncb2024>
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., ... Weinberg, R. A. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature cell biology*, 12(3), 247-256. <https://doi.org/10.1038/ncb2024>
- Mariadason, J. M., Nicholas, C., L'italien, K. E., Zhuang, M., Smartt, H. J. M., Heerdt, B. G., ...

- Augenlicht, L. H. (2005). *Gene Expression Profiling of Intestinal Epithelial Cell Maturation Along the Crypt-Villus Axis*. 128(MICROARRAYS AND OTHER NEW TECHNOLOGIES), 1081-1088. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.054>
- Meibohm, B. (2013). *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Peptide and Protein Therapeutics BT - Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications* (D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm, Éd.). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_5
- Merck Canada Inc. (2015). Cotazym. Dans *Monographie de produit*.
- Merk Canada Inc. (2017). PREGNYL. *Notice d'accompagnement*. Consulté à l'adresse https://www.merck.ca/static/pdf/PREGNYL-17-07_204146_PM_F.pdf
- Meyer, N., & Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer*, 8(12), 976-990. <https://doi.org/10.1038/nrc2231>
- Ministère de la Justice. (2019). *Annexe D, Loi sur les aliments et les drogues*. Consulté à l'adresse <https://laws-lois.justice.gc.ca/PDF/F-27.pdf>
- Montagne, M., Beaudoin, N., Fortin, D., Lavoie, C. L., Klinck, R., & Lavigne, P. (2012). The max b-HLH-LZ can transduce into cells and inhibit c-Myc transcriptional activities. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032172>
- Montagne, M., Naud, J.-F., & Lavigne, P. (2007). *Elucidation of the Structural Determinants Responsible for the Specific Formation of Heterodimeric Mxd1/Max b-HLH-LZ and Its Binding to E-Box Sequences*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.062>
- Montagne, M., Naud, J. F., McDuff, F. O., & Lavigne, P. (2005). Toward the elucidation of the structural determinants responsible for the molecular recognition between Mad1 and Max. *Biochemistry*, 44(38), 12860-12869. <https://doi.org/10.1021/bi0500731>
- Morton, D. B., Abbot, D., Barclay, R., Close, B. S., Ewbank, R., Gask, D., ... Jennings, M. (1993). Removal of blood from laboratory mammals and birds: First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Dans *Laboratory Animals* (Vol. 27). <https://doi.org/10.1258/002367793781082412>
- Nair, S. K., & Burley, S. K. (2003). X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*, 112(2), 193-205. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01284-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01284-9)
- Naud, J.-F., McDuff, F.-O., Sauvé, S., Montagne, M., Webb, B. A., Smith, S. P., ... Lavigne, P. (2005). Structural and Thermodynamical Characterization of the Complete p21 Gene Product of Max. *Biochemistry*, 44, 12746-12758. <https://doi.org/10.1021/bi0500729>
- Naud, J., Gagnon, F., Wellinger, R., Chabot, B., & Lavigne, P. (2003). Improving the Thermodynamic Stability of the Leucine Zipper of Max Increases the Stability of its b-HLH-LZ:E-box complex. *Journal of Molecular Biology*, 326, 1577-1595. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00029-9)
- NIH. (2015). *Guidelines for Survival Bleeding of Mice and Rats*. Consulté à l'adresse https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/rodent_bleeding.pdf
- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., & Kitano, H. (2005). A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology*, 1, 2005.0010. <https://doi.org/10.1038/msb4100014>
- Olfert, D. E. (University of S., Bhasin, J. R. C., Latt, R. (McGill U., Macallum, D. E. (Warner-L.

- C. I. ., McCutcheon, K. (University of M., Rainnie, D. (University of P. E. I.), & Schunk, M. (Pasteur M. C. (1998). *CCAC guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing*.
- Ott, G. (2014). Impact of MYC on malignant behavior. *Hematology*, 2014(1), 100-106. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2014.1.100>
- Palmieri, D., Bronder, J. L., Herring, J. M., Yoneda, T., Weil, R. J., Stark, A. M., ... Steeg, P. S. (2007). Her-2 Overexpression Increases the Metastatic Outgrowth of Breast Cancer Cells in the Brain. *Cancer Res*, 67(9), 4190-4198. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3316>
- Parham Peter. (2014). *The Immune System* (4th Edition, Vol. 88; Garland Science, Éd.). <https://doi.org/978-08153443667>
- Phillips, T., & Hoopes, L. (2008). Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education*, 1(1), 119.
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. (2000). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 10(2), 1-16.
- Santarpia, L., Lippman, S. L., & El-Naggar, A.-K. (2012). *Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF*. 16(1), 103-119. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805.Targeting>
- Sauvé, S., Naud, J.-F., & Lavigne, P. (2007). *The Mechanism of Discrimination between Cognate and Non-Specific DNA by Dimeric b/HLH/LZ Transcription Factors*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.044>
- Schellekens, H., & Jiskoot, W. (2013). *Immunogenicity of Therapeutic Proteins BT - Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications* (D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, & B. Meibohm, Éd.). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6486-0_6
- Sears, R., Nuckolls, F., Haura, E., Taya, Y., Tamai, K., & Nevins, J. R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & Development*, 14(19), 2501-2514. <https://doi.org/10.1101/gad.836800>
- Singh, M., Lima, A., Molina, R., Hamilton, P., Clermont, A. C., Devasthali, V., ... Johnson, L. (2010). Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. *Nature biotechnology*, 28(6), 585-593. <https://doi.org/10.1038/nbt.1640>
- Soucek, L., Helmer-Citterich, M., Sacco, A., Jucker, R., Cesareni, G., & Nasi, S. (1998). Design and properties of a Myc derivative that efficiently homodimerizes. *Oncogene*, 17(19), 2463-2472. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202199>
- Soucek, L., Jucker, R., Panacchia, L., Ricordy, R., Tatò, F., & Nasi, S. (2002). Omomyc, a potential Myc dominant negative, enhances Myc-induced apoptosis. *Cancer research*, 62(12), 3507-3510. Consulté à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067996>
- Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P., Finch, A. J., Murphy, D. J., Sodir, N. M., ... Evan, G. I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature*, 455(7213), 679-683. <https://doi.org/10.1038/nature07260>
- Soucek, L., Whitfield, J. R., Sodir, N. M., Massó-Vallés, D., Serrano, E., Karnezis, A. N., ... Evan, G. I. (2013a). Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes and Development*, 27(5), 504-513.

- <https://doi.org/10.1101/gad.205542.112>
- Soucek, L., Whitfield, J. R., Sodik, N. M., Massó-Vallés, D., Serrano, E., Karnezis, A. N., ... Evan, G. I. (2013b). Inhibition of Myc family proteins eradicates KRas-driven lung cancer in mice. *Genes and Development*, 27(5), 504-513. <https://doi.org/10.1101/gad.205542.112>
- Spark Therapeutics, I. (2017). *LUXTURN A (voretigene neparvovec-rzyl) [package insert]*. 1-16.
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altam, B. J., Hsieh, A. L., & Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism and Cancer. *Dans Cancer Discovery* (Vol. 312). <https://doi.org/10.1001/jama.2014.15298>. Metformin
- Sutradhar, K. B., Khatun, S., Al Mamun, A., & Begum, M. (2011). Distribution and elimination of protein therapeutics: A review. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 1-12. <https://doi.org/10.3329/sjps.v4i2.10433>
- Tabrizi, M. A., Bornstein, G. G., Klakamp, S. L., Drake, A., Knight, R., & Roskos, L. (2009). Translational strategies for development of monoclonal antibodies from discovery to the clinic. *Drug Discovery Today*, 14(5-6), 298-305. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.12.008>
- Tabrizi, M. A., & Roskos, L. K. (2007). Preclinical and clinical safety of monoclonal antibodies. *Drug Discovery Today*, 12(13-14), 540-547. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.05.010>
- Tang, L., & Meibohm, B. (2006, septembre 20). Pharmacokinetics of Peptides and Proteins. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs*, p. 15-43. <https://doi.org/doi:10.1002/9783527609628.ch2>
- Tang, L., Persky, A. M., Hochhaus, G., & Meibohm, B. (2004). Pharmacokinetic aspects of biotechnology products. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93(9), 2184-2204. <https://doi.org/10.1002/jps.20125>
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., & Gary, G. G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer*, 8, 1-20. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-228>
- Taylor, S. C., Berkelman, T., Yadav, G., & Hammond, M. (2013). A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *Molecular Biotechnology*, 55(3), 217-226. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9672-6>
- van den Broek, I., Niessen, W. M. A., & van Dongen, W. D. (2013). Bioanalytical LC-MS/MS of protein-based biopharmaceuticals. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 929, 161-179. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.04.030>
- Vargas, H. M., Amouzadeh, H. R., & Engwall, M. J. (2013). Nonclinical strategy considerations for safety pharmacology: evaluation of biopharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Safety*, 12(1), 91-102. <https://doi.org/10.1517/14740338.2013.745851>
- Vivanco, I. (2014). Targeting molecular addictions in cancer. *British Journal of Cancer*, 111(11), 2033-2038. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.461>
- Vugmeyster, Y. (2012). Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. *World Journal of Biological Chemistry*, 3(4), 73. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v3.i4.73>

- Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K. E., von Eyss, B., Herold, S., ... Eilers, M. (2015). Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, 511(7510). <https://doi.org/10.1038/nature13473>
- Weinstein, I. B., & Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Research*, 68(9), 3077-3080. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3293>
- Wells, J. A., & McClendon, C. L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature*, 450(7172), 1001-1009. <https://doi.org/10.1038/nature06526>
- Werle, M., & Bernkop-Schnürch, A. (2006). Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids*, 30(4), 351-367. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0289-3>
- Whitfield, J. R., Beaulieu, M.-E., & Soucek, L. (2017). Strategies to Inhibit Myc and Their Clinical Applicability. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(February), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00010>
- Whitfield, J. R., & Soucek, L. (2012). Tumor microenvironment: Becoming sick of Myc. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 934-934. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0860-x>
- Wolf, E., Lin, C. Y., Eilers, M., & Levens, D. L. (2015). Taming of the beast: shaping Myc-dependent amplification. *Trends Cell Biol*, 25(4), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.006>
- Yu, C., Niu, X., Jin, F., Liu, Z., Jin, C., & Lai, L. (2016). Structure-based Inhibitor Design for the Intrinsically Disordered Protein c-Myc. *Scientific reports*, 6, 22298. <https://doi.org/10.1038/srep22298>
- Zhang, Q., Zeng, S. X., & Lu, H. (2015). Determination of maximum tolerated dose and toxicity of Inauhzin in mice. *Toxicology Reports*, 2, 546-554. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.02.011>
- Zhang, W., & Liu, H. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9-18. <https://doi.org/10.1007/BF00568631>
- Zhang, X., Ge, Y.-L., & Tian, R.-H. (2009). The knockdown of c-myc expression by RNAi inhibits cell proliferation in human colon cancer HT-29 cells in vitro and in vivo. *Cellular & molecular biology letters*, 14(2), 305-318. <https://doi.org/10.2478/s11658-009-0001-9>
- Zhou, L., Xu, N., Sun, Y., & Liu, X. M. (2014). Targeted biopharmaceuticals for cancer treatment. *Cancer Letters*, 352(2), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.06.020>
- Zhou, Z. Q., & Hurlin, P. J. (2001). The interplay between Mad and Myc in proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology*, 11(11), 10-14. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02121-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02121-3)